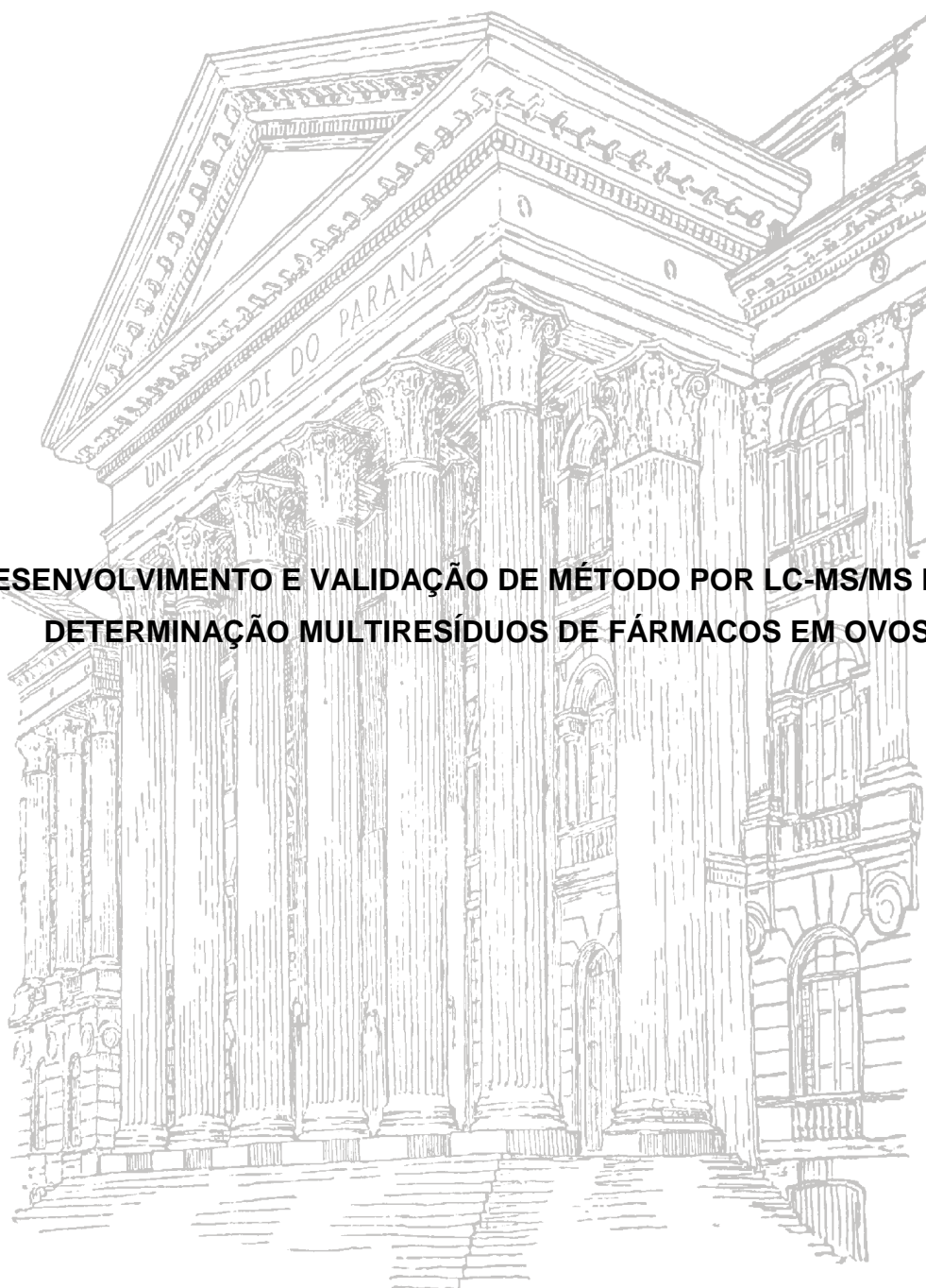


**FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR LC-MS/MS PARA  
DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE FÁRMACOS EM OVOS**



**CURITIBA**

**2015**

**FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR LC-MS/MS PARA  
DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE FÁRMACOS EM OVOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Insumos, Medicamentos e Correlatos, Linha de Pesquisa Produção e Qualidade, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

**CURITIBA**

**2015**

Pontes, Flávia Lada Degaut

Desenvolvimento e validação de método por LC-MS/MS para determinação multirresíduos de fármacos em ovos / Flávia Lada Degaut Pontes – Curitiba, 2015.

241 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Roberto Pontarolo

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2015.

Inclui bibliografia

1. Medicamentos veterinários. 2. Análise de resíduos de ovos. 3. Cromatografia líquida.
4. Espectrometria de massas. I. Pontarolo, Roberto. II. Universidade Federal do Paraná.
- III. Título.

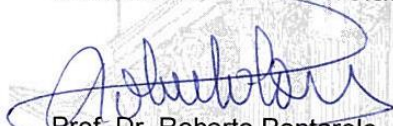
CDD 615.1901

# TERMO DE APROVAÇÃO

**FLÁVIA LADA DEGAUT PONTES**

**Título: “DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR LC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO MULTIRESÍDUOS DE FÁRMACOS EM OVOS”**


Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



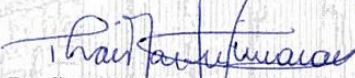
Prof. Dr. Roberto Pontarolo  
Orientador




Profª. Drª. Susanne Rath  
Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas



Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil  
Universidade Estadual do Centro-Oeste do Paraná



Profª. Drª. Thais Martins Guimarães de Francisco  
Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil



Prof. Dr. Carlos Eduardo Rocha Garcia  
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 28 de agosto de 2015.



*Com todo amor à minha melhor amiga, minha mãe,  
Maristela Lada de Oliveira.*

Minha eterna gratidão por todo amor, carinho, paciência e dedicação com que soube me proteger e me educar. Por me incentivar a estudar e a persistir pelos meus sonhos. Por seu jeito meigo e doce de ser, me ensinando diariamente a ser uma pessoa melhor. Amo você.

*Com todo o meu amor ao meu melhor amigo, meu pai,  
Marcelo Carvalho Degaut Pontes.*

Por ser o meu exemplo de dedicação e perseverança, o que me motivou a buscar novos objetivos e a lutar para ter uma qualificação profissional. Agradeço por ser o meu referencial de homem, pois o seu amor, carinho e intensas horas de trabalho me possibilitaram a oportunidade de concretizar sonhos. Te amo careca.

*Com todo o meu amor ao meu noivo,  
Herlon Alves Cardozo.*

Por ser o melhor presente que recebi de Deus. “Você veio pra ficar, você que me faz feliz, você que me faz cantar, assim...” (Marisa Monte). Minha eterna gratidão por seu carinho, amor e dedicação. Por sua imensa paciência nos meus momentos de estresse e por sua compreensão nos meus momentos de ausência. Obrigada por tornar os meus dias mais felizes e por ser o amor da minha vida. Eu te amo.

## AGRADECIMENTOS

*Maís uma vez, ao longo dessa caminhada, muitas pessoas colaboraram para que esse trabalho pudesse ser concluído e, neste momento, as palavras chegam a ser poucas para expressar o meu carinho e a minha eterna gratidão ...*

*A Deus e a Nossa Senhora do Carmo,*  
por abençoarem a minha vida, me dando fé, coragem, paciência e perseverança ao longo dessa jornada.

*Aos pais de coração, Luciane da Cunha Degaut Pontes e Laerte de Oliveira,*  
por agregarem valores importantes na minha vida, os quais foram fundamentais para a construção do meu caráter. Sou grata pela generosidade, amor, carinho, paciência e dedicação com que me acolheram em suas vidas. Obrigada por fazerem parte do meu universo, com certeza ele não teria o mesmo brilho sem vocês.

*Aos meus irmãos, João Vítor Degaut Pontes e Maria Eduarda Degaut Pontes,*  
por estarem sempre perto mesmo que distantes e por tornarem a minha vida mais completa e feliz, repleta de bons momentos e recordações. Amo vocês.

*Aos meus avós, Eugênio Lada (in memoriam) e Salomeia Lada,*  
pelo carinho e amor incondicional que dedicaram a mim ao longo dos anos e por me ensinaram as coisas simples, porém fundamentais da vida. Amo vocês.

*Aos meus avós, Ubyrathan Degaut Pontes e Solange Godoy,*  
por todo carinho e atenção. Amo vocês.

*Ao meu sogro João Alves Cardozo e às minhas sogras Roseli Cardozo e Antônia Alves Cardoso (in memoriam),*  
por me receberem na família de vocês com tanto carinho, respeito e amor.

*À minha enteada Maria Julia de Oliveira Reis Cardozo,*  
que com sua doçura e maturidade conquistou o meu coração. Obrigada pequenina por me deixar fazer parte da sua vida e por fazer parte da minha.

*Aos meus queridos cunhados Emerson Alves Cardozo e Alinne Paula de Oliveira Cardozo, e a doce afilhada Carolina de Oliveira Cardozo,*  
por me contagiarem com sua alegria e perseverança, e por me acolherem com tanto carinho e amor.

*Aos meus familiares, Álvaro Lada, Dóris Souza, Arnaldo Lada, Maricélia Lada, Gabriel Lada Andretti, Aldair Andretti, Dirce Regina Lobo dos Santos, Ricardo dos Santos Lada, Fábio dos Santos Lada, Giselle Ramos, Nicolas Lada, Marlí Schafhauser, Filipe Schafhauser Lada, Patrícia Schafhauser Lada, Júlia Schafhauser Lada, Luciana Schafhauser Lada, Márcia Carvalho Degaut Pontes e Felipe Degaut Pontes,*  
por todos os momentos maravilhosos e inesquecíveis, por contribuírem para o meu crescimento pessoal, pelos conselhos, amor e carinho.

*Ao Prof. Dr. Roberto Pontarolo,*  
o qual tenho a honra de ter tido como orientador. Agradeço por ter me acolhido em seu laboratório e pela oportunidade de aprendizado, permanecendo ao meu lado ao longo desses quatro anos, resolvendo problemas e propondo soluções. Sou grata pela amizade, confiança e incentivo na realização deste trabalho. Meu respeito e admiração.

*Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial à Prof. Dra. Marilís Dallarmi Miguel, à Prof. Dra. Angela Cristina Leal Badaró Trindade, à Prof. Dra. Francinete Ramos Campos e ao Prof. Dr. Alan Guilherme Gonçalves,*  
sempre prontos a ajudar e sugerir mudanças para melhor.

*Ao Me. Daniel Altino de Jesus,*  
que me acolheu no LACEN-PR e sugeriu a realização desse trabalho. Agradeço pela confiança e pela gentil doação de padrões analíticos.

*Aos queridos amigos e incentivadores Dra. Thaís Martins Guimarães de Francisco, Dr. Mário Sérgio Piantavini e Dr. João Cleverson Gasparetto,*  
por toda disponibilidade, ao deixarem seus afazeres, para contribuir com sua experiência no aprimoramento deste trabalho e no meu crescimento como pesquisadora. Meu carinho, amizade, respeito, admiração e enorme gratidão.

*Aos meus eternos amigos, Nicole Glock Maceno, Marcelo Campese, Fernanda Fabíola Salamanca, Rafaella Ezidório, Ana Paula Studzinski, Padre Benedito de Assis, Heitor Lipinski, Helaine Cristina, Jocélia Kusma, Marcela Gayer, Rodrigo Trierweiler, Fernanda de Aquino Modesto, Nathalie Baldissera Amarante, Emerson Luiz Amarante, Simone Tavares, Bruno Izidoro, Larissa Fracaro, Evandro Fracaro*  
e tantos outros que a vida me deu, com os quais cresci, aprendi e convivi. Obrigada pelo carinho, amizade, presença e apoio.

*À Consuelo Reis Pereira, Sirlei Sayomi Hayashi, Caroline Paola Uber, Letícia Paula Leonart, Cleverson Antônio Ferreira Martins, Helena Hiemisch Lobo Borba, Suzane Virtuoso, Suelem Tavares da Silva, Raquel Vilhena, Breno Marson, Luna Assis Gonçalves, Camilla Madeira, Lorilei de Fátima Wzorek, Giovanna Strapasson, Samanta Golin, Rômulo Pereira Ribeiro, Cássio Marques Perlín, Mariana Millan Fachí, Astrid Wiens, Marco André Cardoso, Letícia Cerqueira Bonâncio, Leandro Xavier Weiss, Ricardo Saad Henriques, Fernanda Stumpf Tonin, Wilton Kawaguchi, Reginaldo Thuler, Heloise Calzado, Daniele de Paula e a todos os outros colegas de pós-graduação pelo carinho, amizade, apoio, companheirismo e agradável convívio ao longo desses anos.*

*Ao querido secretário da Pós-Graduação, Jean Godói por toda gentileza e atenção que nos dedica diariamente.*

*Aos amigos que conquistei na Unicentro, Patrícia de Paula Carneiro, Prof. Luciana Erzinger Alves de Camargo, Prof. Lígia Santos Pedroso, Prof. Leandro Freire dos Santos, Prof. Jacqueline Aparecida Eidam Horst, Prof. Marco Aurélio Romano, Prof. Daniel Brustolin Ludwig, Prof. Najeh Khalil, Prof. Rubiana Mainardes, Prof. Larissa Sakis Bernardi, Prof. Paulo Renato Oliveira e aos demais professores do corpo docente, por todo carinho e atenção que me acolheram na Instituição e na cidade de Guarapuava durante o período que lecionei.*

*As senhoras responsáveis pela limpeza do prédio de Farmácia da UFPR: Izabel Simone Gomes, Mariliza de Fátima Oliveira, Helena, Rosângela Oliveira da Rocha, Fabiana, Érica Pereira Chaves e Maria da Penha, por todo o carinho e atenção, mas principalmente, pela gentileza de manterem o nosso ambiente de trabalho limpo e aconchegante.*

*A Fundação Araucária,  
Pelo financiamento desse projeto de pesquisa.*

*A Capes,  
pela bolsa de estudo concedida.*

*Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.  
Muito obrigada!*

*"Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá."*

*Ayrton Senna*

## RESUMO

Fármacos veterinários são amplamente utilizados na avicultura de postura tanto para o tratamento de diferentes doenças quanto como promotores do crescimento. A presença de resíduos de medicamentos veterinários em ovos é um problema de saúde pública, pois o consumo desse alimento contaminado pode desencadear reações alérgicas e ainda contribuir para o desenvolvimento de espécies resistentes de bactérias. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS) para a detecção e quantificação simultânea de 22 drogas veterinárias em ovos, contemplando 8 classes farmacológicas (tetraciclinas, sulfonamidas, coccidiostáticos, macrolídeos, lincosamidas, benzimidazóis, diterpenos e diaminopirimidinas). As análises foram conduzidas em um cromatógrafo acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo, operando com interface *electrospray* no modo positivo de ionização. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna XBridge BEH C18 (150 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m, Waters, EUA) acoplada a uma pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm, 3,5  $\mu$ m, Waters, EUA), ambas mantidas a 35 °C. A fase móvel foi eluída a 400  $\mu$ L min<sup>-1</sup> no modo gradiente entre água e metanol/acetonitrila (20:80 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram preparadas através da técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila. O extrato obtido foi diluído com acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v) e uma alíquota de 10  $\mu$ L foi injetada no cromatógrafo. Os resultados de validação mostraram que o método é seletivo e livre de efeito residual e de matriz. O método apresentou baixos limites de detecção (0,37 a 7,5  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>) e de quantificação (1,25 a 20  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>). Para substâncias proibidas, os valores de limite de decisão (CC $\alpha$ ) e capacidade de detecção (CC $\beta$ ) ficaram entre 0,62 a 7,5  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> e 0,65 a 8,1  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Para substâncias com limite máximo de resíduo permitido, os valores de CC $\alpha$  e CC $\beta$  ficaram entre 2,15 a 1061,5  $\mu$ g kg<sup>-1</sup> e 2,3 a 1135,9  $\mu$ g kg<sup>-1</sup>, respectivamente. As curvas de calibração apresentaram uma excelente correlação ( $r \geq 0,99$ ) para todos os analitos ao longo dos diferentes intervalos de concentração. A recuperação dos analitos e padrões internos (49,0 a 103,7%) foi obtida com elevada precisão (CV < 8%). Nos diferentes níveis de concentração as variações de precisão e exatidão, em termos de repetibilidade e reprodutibilidade intra-laboratorial, foram < 11%. O método validado foi aplicado com sucesso para determinar resíduos de medicamentos veterinários em quinze amostras de ovos comerciais. Somente uma amostra estava contaminada com resíduos de doxiciclina, sulfametoxazol e trimetoprim, os quais tem o uso proibido em animais cujos ovos sejam produzidos para consumo humano. Esse método é aplicável para análises de rotina e pode ser implementado nos planos nacionais de controle de resíduos, contribuindo para a segurança alimentar da população.

Palavras-chave: medicamentos veterinários, análise de resíduos, ovos, cromatografia líquida, espectrometria de massas

## ABSTRACT

Veterinary drugs are widely used in laying poultry both for the treatment of different diseases and as growth promoters. The presence of veterinary drug residues in hen eggs is a public health problem, because the consumption of this contaminated food can cause allergic reactions and contribute to the development of resistant strains of bacteria. The present work aimed to develop and validate a method for high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for detection and simultaneous quantification of 22 veterinary drugs in eggs, contemplating 8 classes (tetracyclines, sulfonamides, coccidiostats, macrolides, lincosamides, benzimidazole, diterpenes and diaminopyrimidines). Analyses were conducted on a chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer operating in electrospray positive ion mode. Chromatographic separations were achieved on XBridge BEH C18 column (150 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters, EUA) coupled with a XBridge BEH C18 guard column (10 x 2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ , Waters, EUA), both maintained at 35 °C. The mobile phase was eluted at 400  $\mu\text{L min}^{-1}$  in the gradient mode between water and methanol/acetonitrile (20:80 v/v), both containing 0.1% formic acid. The samples were prepared by protein precipitation with acetonitrile. The extract was diluted with sodium acetate 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrile/methanol (70:24:6 v/v/v) and an aliquot of 10  $\mu\text{L}$  was injected into the chromatograph. Data from validation studies demonstrated that the new method is highly selective and free of matrix and residual effects. The method presented low limits of detection (0.37 a 7.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) and quantification (1.25 a 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). For banned substances, decision limit values ( $\text{CC}\alpha$ ) and detection capability ( $\text{CC}\beta$ ) were between 0.62 to 7.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 0.65 to 8.1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. For substances with maximum residue limit allowed, the  $\text{CC}\alpha$  and  $\text{CC}\beta$  values were between 2.15 to 1061.5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  and 2.3 to 1135.9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectively. The calibration curves showed excellent correlation ( $r \geq 0.99$ ) for all analytes along different concentration ranges. The recovery of the analytes and internal standards (49.0 to 103.7%) was reached with high precision ( $\text{CV} < 8\%$ ). In the different levels of concentration the variations of precision and accuracy, in terms of repeatability and within-laboratory reproducibility, were  $< 11\%$ . The validated method was successfully applied to determine the veterinary drug residues in fifteen commercial egg samples. Only one sample was contaminated with residues of doxycycline, sulfamethoxazole and trimethoprim, which are prohibited for use in animals from which eggs are produced for human consumption. This method is applicable to routine analysis and can be implemented in the national residue control plans, contributing to the food security of the population.

**Keywords:** veterinary medicines, residue analysis, eggs, liquid chromatography, mass spectrometry



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS TETRACICLINAS.....	61
FIGURA 2 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS MACROLÍDEOS.....	61
FIGURA 3 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SULFONAMIDAS.....	62
FIGURA 4 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COCCIDIOSTÁTICOS.....	63
FIGURA 5 –	ESTRUTURA QUÍMICA DO FLUBENDAZOL (FLU), TRIMETOPRIM (TMP), TIAMULINA (TIA) E LINCOMICINA (LIN).....	63
FIGURA 6 –	ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PADRÕES INTERNOS.....	64
FIGURA 7 –	ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 500 $M/Z$ ) DAS SULFONAMIDAS E TETRACICLINAS OBTIDO POR INFUSÃO DIRETA DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO 250 $\text{ng mL}^{-1}$ DE CADA ANALITO EM ACETONITRILA/ÁGUA (50:50 V/V) COM ÁCIDO FÓRMICO A 0,1%.....	92
FIGURA 8 –	ESPECTRO DE VARREDURA (600 A 800 $M/Z$ ) DOS COCCIDIOSTÁTICOS OBTIDO POR INFUSÃO DIRETA DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO 1000 $\text{ng mL}^{-1}$ DE CADA ANALITO EM ACETONITRILA/ÁGUA (50:50 V/V) COM ÁCIDO FÓRMICO A 0,1%.....	92
FIGURA 9 –	INTENSIDADE DE SINAL DAS TETRACICLINAS, COCCIDIOSTÁTICOS, BENZIMIDAZOL, DITERPENOS, DIAMINOPYRIMIDINA, LINCOSAMIDA E MACROLÍDEOS UTILIZANDO COMO ADITIVO ÁCIDO FÓRMICO E FORMIATO DE AMÔNIO.....	94
FIGURA 10 –	INTENSIDADE DE SINAL DAS SULFONAMIDAS E PADRÕES INTERNOS UTILIZANDO COMO ADITIVO ÁCIDO FÓRMICO E FORMIATO DE AMÔNIO.....	95
FIGURA 11 –	ÍONS FRAGMENTOS DA DOXICICLINA (A) E DA TETRACICLINA (B) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM.....	98
FIGURA 12 –	ÍONS FRAGMENTOS DA SULFACETAMIDA ( $M/Z$ 215,3) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM.....	99
FIGURA 13 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	101

FIGURA 14 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	101
FIGURA 15 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	102
FIGURA 16 –	CROMATOGRAMA DOS ÍONS TETRACICLINA E DOXICICLINA.....	103
FIGURA 17 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	104
FIGURA 18 –	CROMATOGRAMA DOS ÍONS TETRACICLINA (M/Z 410) E DOXICICLINA (M/Z 428).....	104
FIGURA 19 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/ METANOL, 80:20 V/V (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	106
FIGURA 20 –	CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM MATRIZ, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/ METANOL, 80:20 V/V (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	107
FIGURA 21 –	CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA NARASINA.....	107
FIGURA 22 –	CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS SULFACETAMIDA, SULFADIAZINA, SULFATIAZOL, LINCOMICINA, SULFAMERAZINA, SULFAMERAZINA DEUTERADA, TRIMETOPRIM E OXITETRACICLINA.....	108
FIGURA 23 –	CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS SULFAMETAZINA, TETRACICLINA, SULFAMETOXIPIRIDAZINA, DEMECLOCICLINA, SULFACLORPIRIDAZINA, SULFAMETOXAZOL, CAMBENDAZOL E CLORTETRACICLINA.....	109
FIGURA 24 –	CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS DOXICICLINA, SULFADIMETOXINA, SULFAQUINOXALINA, ERITROMICINA, TILOSINA, FLUBENDAZOL, TIAMULINA E LASALOCID.....	110
FIGURA 25 –	CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS NARASINA E NIGERICINA.....	111

FIGURA 26 –	CROMATOGRAMAS DOS DILUENTES AO UTILIZAR ACETONITRILA/METANOL (1:1 V/V) E ACETONITRILA/METANOL (1:1 V/V) CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO NA LIMPEZA DA SERINGA DO INJETOR AUTOMÁTICO.....	112
FIGURA 27 –	RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ DE OVO COM DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO.....	114
FIGURA 28 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR LC-MS/MS PARA O ESTUDO DE SELETIVIDADE.....	115
FIGURA 29 –	CURVA ANALÍTICA DA CLORTETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	118
FIGURA 30 –	CURVA ANALÍTICA DA DOXICICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	119
FIGURA 31 –	CURVA ANALÍTICA DA ERITROMICINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	120
FIGURA 32 –	CURVA ANALÍTICA DO FLUBENDAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	121
FIGURA 33 –	CURVA ANALÍTICA DO LASALOCID, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	122
FIGURA 34 –	CURVA ANALÍTICA DA LINCOMICINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	123
FIGURA 35 –	CURVA ANALÍTICA DA NARASINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	124
FIGURA 36 –	CURVA ANALÍTICA DA OXITETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	125
FIGURA 37 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFACETAMIDA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	126
FIGURA 38 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFACLORPIRIDAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	127

FIGURA 39 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFADIAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	128
FIGURA 40 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFADIMETOXINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	129
FIGURA 41 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFAMERAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	130
FIGURA 42 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	131
FIGURA 43 –	CURVA ANALÍTICA DO SULFAMETOXAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	132
FIGURA 44 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	133
FIGURA 45 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFAQUINOXALINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	134
FIGURA 46 –	CURVA ANALÍTICA DA SULFATIAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	135
FIGURA 47 –	CURVA ANALÍTICA DA TETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	136
FIGURA 48 –	CURVA ANALÍTICA DA TIAMULINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	137
FIGURA 49 –	CURVA ANALÍTICA DA TILOSINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	138
FIGURA 50 –	CURVA ANALÍTICA DO TRIMETOPRIM, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X.....	139
FIGURA 51 –	CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR LC-MS/MS ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE AMOSTRAS PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO (A1, A2, A3) E AMOSTRAS DE OVO ISENTAS DOS ANALITOS DE INTERESSE (B1, B2, B3).....	140

FIGURA 52 –	ESTABILIDADE DA CLORTETRACICLINA, DEMECLOCICLINA, DOXICICLINA, OXITETRACICLINA, TETRACICLINA E LINCOMICINA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	169
FIGURA 53 –	ESTABILIDADE DA SULFACETAMIDA, SULFACLORPIRIDAZINA, SULFADIAZINA, SULFADIMETOXINA, SULFAMERAZINA E SULFAMERAZINA DEUTERADA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	170
FIGURA 54 –	ESTABILIDADE DA SULFAMETAZINA, SULFAMETOXAZOL, SULFAMETOXIPYRIDAZINA, SULFAQUINOXALINA, SULFATIAZOL E TRIMETOPRIM EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	171
FIGURA 55 –	ESTABILIDADE DO LASALOCID, NARASINA, NIGERICINA, TIAMULINA, ERITROMICINA E TILOSINA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	172
FIGURA 56 –	ESTABILIDADE DO FLUBENDAZOL E CAMBENDAZOL EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES.....	173
FIGURA 57 –	ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM MATRIZ APÓS O PERÍODO DE 1, 2, 3 E 4 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO EM <i>FREEZER</i> A -40 °C.....	174
FIGURA 58 –	ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM AMOSTRA PÓS-PROCESSAMENTO APÓS O PERÍODO DE 24 A 48 HORAS DE ARMAZENAMENTO EM GERENCIADOR DE AMOSTRAS A 20 °C.....	175
FIGURA 59 –	CROMATOGRAMA DA AMOSTRA 13 OBTIDO POR LC-MS/MS.....	177

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS PARA MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM OVO SEGUNDO A RDC N. 53, DE 02 DE OUTUBRO DE 2012.....	35
TABELA 2 –	EXEMPLOS DE COEFICIENTES DE VARIAÇÃO EM CONDIÇÕES DE REPRODUTIBILIDADE PARA MÉTODOS QUANTITATIVOS.....	53
TABELA 3 –	VERACIDADE MÍNIMA DE MÉTODOS QUANTITATIVOS.....	54
TABELA 4 –	PLANO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO.....	57
TABELA 5 –	SUBSTÂNCIAS COM LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO ESTABELECIDO PARA O OVO.....	68
TABELA 6 –	SUBSTÂNCIAS CUJO USO NÃO É AUTORIZADO PARA ANIMAIS PRODUTORES DE OVOS PARA CONSUMO HUMANO.....	68
TABELA 7 –	SOLVENTES UTILIZADOS NOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	72
TABELA 8 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO.....	74
TABELA 9 –	VALORES DO LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR) PARA SUBSTÂNCIAS PERMITIDAS.....	78
TABELA 10 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS ANALITOS EM ESTUDO.....	79
TABELA 11 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ.....	81
TABELA 12 –	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO.....	83
TABELA 13 –	VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	84
TABELA 14 –	VALORES ACEITÁVEIS PARA A EXATIDÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO.....	84
TABELA 15 –	VARIAÇÃO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	85

TABELA 16 –	VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ.....	86
TABELA 17 –	RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE OVOS ANALISADAS PELO MÉTODO LC-MS/MS E SUAS CARACTERÍSTICAS DE COR, TIPO, CLASSE E FABRICAÇÃO.....	89
TABELA 18 –	ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO.....	96
TABELA 19 -	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	100
TABELA 20 –	LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR), LIMITE DE DETECÇÃO (LD), LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ), LIMITE DE DECISÃO ( $CC_{\alpha}$ ) E CAPACIDADE DE DETECÇÃO ( $CC_{\beta}$ ) DOS ANALITOS EM ESTUDO.....	116
TABELA 21 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA CLORTETRACICLINA.....	118
TABELA 22 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA CLORTETRACICLINA.....	118
TABELA 23 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA DOXICICLINA.....	119
TABELA 24 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA DOXICICLINA.....	119
TABELA 25 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA ERITROMICINA.....	120
TABELA 26 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA ERITROMICINA.....	120
TABELA 27 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO FLUBENDAZOL.....	121
TABELA 28 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO FLUBENDAZOL.....	121
TABELA 29 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO LASALOCID.....	122



TABELA 30 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO LASALOCID.....	122
TABELA 31 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA LINCOMICINA.....	123
TABELA 32 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA LINCOMICINA.....	123
TABELA 33 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA NARASINA.....	124
TABELA 34 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA NARASINA.....	124
TABELA 35 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA OXITETRACICLINA.....	125
TABELA 36 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA OXITETRACICLINA.....	125
TABELA 37 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFACETAMIDA.....	126
TABELA 38 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFACETAMIDA.....	126
TABELA 39 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFACLORPIRIDAZINA.....	127
TABELA 40 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFACLORPIRIDAZINA.....	127
TABELA 41 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFADIAZINA.....	128
TABELA 42 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFADIAZINA.....	128
TABELA 43 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFADIMETOXINA.....	129
TABELA 44 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFADIMETOXINA.....	129
TABELA 45 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMERAZINA.....	130

TABELA 46 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMERAZINA.....	130
TABELA 47 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETAZINA.....	131
TABELA 48 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMETAZINA.....	131
TABELA 49 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO SULFAMETOXAZOL.....	132
TABELA 50 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO SULFAMETOXAZOL.....	132
TABELA 51 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA.....	133
TABELA 52 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA.....	133
TABELA 53 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAQUINOXALINA.....	134
TABELA 54 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAQUINOXALINA.....	134
TABELA 55 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFATIAZOL.....	135
TABELA 56 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO SULFATIAZOL.....	135
TABELA 57 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TETRACICLINA.....	136
TABELA 58 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TETRACICLINA.....	136
TABELA 59 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TIAMULINA.....	137
TABELA 60 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TIAMULINA.....	137
TABELA 61 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TILOSINA.....	138

TABELA 62 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TILOSINA.....	138
TABELA 63 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO TRIMETOPRIM.....	139
TABELA 64 –	ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO TRIMETOPRIM.....	139
TABELA 65 –	VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DOS ANALITOS EM ESTUDO CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ (n=6).....	141
TABELA 66 –	EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÕES INTERNOS OBTIDA ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA.....	143
TABELA 67 –	VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.....	147
TABELA 68 –	VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL.....	151
TABELA 69 –	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE CONTROLE DE DILUIÇÃO.....	155
TABELA 70 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA PROPORÇÃO DE ACETONITRILA.....	159
TABELA 71 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE SONICAÇÃO.....	162
TABELA 72 –	RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA TEMPERATURA DE CENTRIFUGAÇÃO.....	165
TABELA 73 –	RESULTADOS OBTIDOS COM AMOSTRAS DE OVOS ANALISADAS PELO MÉTODO DESENVOLVIDO.....	176

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAD	- Gás de colisão
CAM	- Cambendazol
CC $\alpha$	- Limite de decisão
CC $\beta$	- Capacidade de detecção
CCE	- Comissão das Comunidades Europeias
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de entrada na cela de colisão
cps	- Ciclos por segundo
CTC	- Clortetraciclina
CUR	- Gás de interface
CV	- Coeficiente de variação
CXP	- Potencial de saída da cela de colisão
DMC	- Demeclociclina
DP	- Potencial de desagrupamento
DPR	- Desvio padrão relativo
DXC	- Doxíciclina
ELL	- Extração líquido-líquido
EP	- Potencial de entrada
ER	- Erro relativo
ERY	- Eritromicina
ESI	- <i>Electrospray</i>
eV	- Elétron-volt
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
FDA	- Food and Drug Administration
FIA	- Análise por injeção em fluxo
FLU	- Flubendazol
FMN	- Fator de matriz normalizado
GS1	- Gás de nebulização
GS2	- Gás auxiliar
HPLC-DAD	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos
HPLC-FLU	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência
HPLC-UV	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Ultravioleta
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IS	- Voltagem do capilar
LAS	- Lasalocid
LC-MS	- Cromatografia líquida acoplada à Espectrometria de Massas
LC-MS/MS	- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
LD	- Limite de detecção
LIN	- Lincomicina
LMR	- Limite máximo de resíduo
LQ	- Limite de quantificação
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MI	- <i>Multiple ions</i>
MNV	- Menor nível de validação
MRC	- Material de referência certificado
MRM	- <i>Multiple reaction monitoring</i>
ms	- <i>Millisecond</i>
<i>m/z</i>	- Massa/carga
NAR	- Narasina
NIG	- Nigericina
OTC	- Oxitetraciclina
PAMVet	- Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo
PI	- Padrão interno
PLE	- Extração por líquido pressurizado
PNCRC	- Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminante em Produtos de Origem Animal
r	- Coeficiente de correlação
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
SCP	- Sulfaclopiridazina
SCT	- Sulfacetamida
SDMX	- Sulfadimetoxina
SDZ	- Sulfadiazina
SMPZ	- Sulfametoxipiridazina
SMR	- Sulfamerazina
SMR-D4	- Sulfamerazina deuterada
SMX	- Sulfametoxazol
SMZ	- Sulfametazina
SPE	- Extração em fase sólida
SQ	- Sulfaquinoxalina

STZ	- Sulfatiazol
TC	- Tetraciclina
TIA	- Tiamulina
TMP	- Trimetoprim
TYL	- Tilosina
UE	- União Europeia
UPLC-MS/MS	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial
UPLC-QTOF-MS	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Analisador Híbrido Quadrupolo-Tempo de Voo
UPLC-TOF-MS	- Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução por Tempo de Voo
V	- Volts

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>28</b>
1.1	OBJETIVO GERAL.....	31
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>32</b>
2.1	A AVICULTURA DE POSTURA – PANORAMA NACIONAL E ESTADUAL.....	33
2.2	MEDICAMENTOS UTILIZADOS NA AVICULTURA DE POSTURA NO ESTADO DO PARANÁ.....	33
2.3	RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS.....	34
2.4	PROGRAMAS DE MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS.....	36
2.5	MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO EM OVOS.....	38
2.5.1	Métodos por HPLC-UV, HPLC-DAD e HPLC-FLU para determinação de resíduos de medicamentos em ovos.....	38
2.5.2	Métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de medicamentos em ovos.....	41
2.6	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS.....	45
2.6.1	Seletividade.....	45
2.6.2	Limite de detecção.....	46
2.6.3	Limite de quantificação.....	46
2.6.4	Limite de decisão.....	46
2.6.5	Capacidade de detecção.....	47
2.6.6	Linearidade.....	48
2.6.7	Efeito matriz.....	49
2.6.8	Efeito residual.....	50
2.6.9	Recuperação (Eficiência da extração).....	50
2.6.10	Precisão.....	51
2.6.10.1	Repetibilidade.....	51
2.6.10.2	Reprodutibilidade intralaboratorial.....	52
2.6.11	Exatidão.....	53
2.6.11.1	Veracidade.....	54
2.6.11.2	Exatidão (Ensaio de recuperação).....	55
2.6.12	Robustez.....	56
2.6.13	Estabilidade .....	56
2.6.13.1	Estabilidade do analito em solução.....	57
2.6.13.2	Estabilidade do analito na matriz.....	57



<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
3.1	AMOSTRAS DE OVOS.....	60
3.2	PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES.....	60
3.3	PREPARO DAS SOLUÇÕES .....	64
3.4	EQUIPAMENTOS, INSTRUMENTOS E CONSUMÍVEIS.....	65
3.5	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS.....	66
3.5.1	Seleção dos analitos de interesse.....	66
3.5.2	Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	68
3.5.3	Otimização da cromatografia.....	69
3.6	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ.....	70
3.7	PREPARO DAS AMOSTRAS DE OVO.....	72
3.8	INSTRUMENTAÇÃO.....	73
3.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS.....	76
3.9.1	Seletividade.....	76
3.9.2	Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).....	76
3.9.3	Linearidade.....	78
3.9.4	Efeito matriz.....	80
3.9.5	Efeito residual.....	81
3.9.6	Recuperação (Eficiência da extração).....	81
3.9.7	Precisão e exatidão.....	82
3.9.8	Controle de diluição – precisão e exatidão.....	84
3.9.9	Robustez.....	85
3.9.10	Estabilidade.....	86
3.9.10.1	Estabilidade dos analitos em solução.....	86
3.9.10.2	Estabilidade dos analitos em matriz.....	87
3.9.10.3	Estabilidade dos analitos na amostra pós-processamento....	88
3.10	ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE OVO.....	88
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>90</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS.....	91
4.1.1	Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas.....	91
4.1.1.1	Otimização do sinal dos analitos.....	91
4.1.1.2	Análise por <i>Multiple Reaction Monitoring</i> (MRM).....	96
4.1.1.3	Análise por Injeção em Fluxo (FIA).....	99
4.1.2	Otimização da cromatografia.....	100
4.1.2.1	Otimização do solvente de limpeza do injetor automático.....	111
4.2	DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ.....	112
4.3	VALIDAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS.....	115
4.3.1	Seletividade.....	115

4.3.2	Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ ).....	116
4.3.3	Linearidade.....	117
4.3.4	Efeito residual.....	140
4.3.5	Efeito matriz.....	141
4.3.6	Recuperação (Eficiência da extração).....	142
4.3.7	Precisão e exatidão.....	146
4.3.7.1	Repetibilidade.....	146
4.3.7.2	Reprodutibilidade intralaboratorial.....	150
4.3.8	Controle de diluição – precisão e exatidão.....	154
4.3.9	Robustez.....	157
4.3.10	Estabilidade.....	168
4.3.10.1	Estabilidade dos analitos em solução.....	168
4.3.10.2	Estabilidade dos analitos em matriz.....	173
4.3.10.3	Estabilidade dos analitos em amostra pós-processamento...	175
4.4	DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE OVOS UTILIZANDO LC-MS/MS.....	176
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>178</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>180</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>197</b>
	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>198</b>
	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>204</b>
	<b>ANEXO 3.....</b>	<b>212</b>
	<b>ANEXO 4.....</b>	<b>236</b>
	<b>ANEXO 5.....</b>	<b>238</b>
	<b>ANEXO 6.....</b>	<b>240</b>

---

# 1. INTRODUÇÃO

---

Medicamentos veterinários são utilizados na criação de animais por diferentes razões, como na prevenção e tratamento de doenças e ainda como promotores de crescimento. Em princípio, todas as preparações administradas podem conduzir à presença de resíduos de fármacos nos alimentos de origem animal, como leite, carne e ovos. Estes resíduos podem incluir o composto original não alterado bem como os metabólitos e/ou conjugados, os quais podem ter efeitos tóxicos sobre os consumidores, como reações alérgicas ou resistência a antibióticos, através da indução de cepas resistentes (PASCHOAL *et al.*, 2008; PACHECO-SILVA; DE SOUZA; CALDAS, 2014).

Para controlar o problema dos resíduos, diversas autoridades sanitárias, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Comissão Europeia, Food and Drug Administration (FDA) e *Codex Alimentarius*, fixaram Limites Máximos de Resíduos (LMR) para uma variedade de fármacos veterinários em diferentes alimentos de origem animal. Estes limites são estabelecidos para garantir o uso adequado destes produtos, segundo as boas práticas de uso de medicamentos veterinários, limitando a exposição dos consumidores a fim de evitar ou minimizar problemas de saúde pública (PACHECO-SILVA; DE SOUZA; CALDAS, 2014).

Apesar das medidas referidas, o uso impróprio de medicamentos veterinários não pode ser descartado. Nesse contexto, os métodos analíticos são ferramentas fundamentais para as inspeções efetuadas pelas autoridades sanitárias. Por razões de custo e benefício, o desenvolvimento de métodos capazes de detectar, confirmar e quantificar simultaneamente diversos compostos tornou-se uma necessidade para a análise de resíduos e contaminantes em amostras de alimentos, contribuindo para assegurar que esses estejam de acordo com o preconizado na legislação (PASCHOAL *et al.*, 2008).

No âmbito da análise de resíduos de fármacos veterinários em ovo, se destacam os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando detector ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD), fluorescência (FLU) e, mais recentemente, acoplado à espectrometria de massas (MS).

Os métodos HPLC baseados em detecção UV, DAD e FLU apresentam moderada sensibilidade e seletividade para matrizes complexas como o ovo, exigindo longas corridas cromatográficas para uma separação adequada dos analitos ou complexos processos de extração para garantir seletividade. Além disso,

métodos por HPLC-FLU necessitam muitas vezes de uma etapa de derivatização, o que torna o preparo da amostra demorado e laborioso.

Recentemente, métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas de alta resolução, como a espectrometria de massas de tempo de voo (TOF-MS), têm sido utilizados para analisar centenas de compostos em ovos e outras matrizes alimentares. Entretanto, apesar das inúmeras vantagens, esses métodos são adequados apenas para análises de triagem e não para fins de confirmação, segundo o guia de validação da Comissão Europeia (Diretiva 2002/657/EC).

Atualmente, a técnica de escolha para a análise de resíduos de medicamentos é a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), pois fornece uma identificação inequívoca e uma confirmação confiável, visto que combina a separação do analito com a elucidação estrutural, atendendo aos requisitos da Diretiva 2002/657/EC (KENNEDY *et al.*, 1998). Além disso, a alta sensibilidade dessa técnica tem permitido a quantificação de resíduos na ordem de microgramas por quilo.

Vários métodos por LC-MS/MS têm sido publicados para análise de resíduos de medicamentos em ovos, entretanto são poucos os que analisam simultaneamente mais de uma classe farmacológica (HELLER; NOCHETTO, 2004; HELLER *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2008; MOL, H. G. J. *et al.*, 2008; PETERS *et al.*, 2009; FRENICH *et al.*, 2010; SPISSO *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2011; CAPRIOTTI *et al.*, 2012; GAJDA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; NAKAJIMA *et al.*, 2012; ROBERT *et al.*, 2013; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015).

Os métodos publicados por Mol *et al.* (2008), Peters *et al.* (2009) e Deng *et al.* (2011), utilizam a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de tempo de voo (TOF-MS), a qual é adequada apenas para análises de triagem. O método desenvolvido por Robert *et al.* (2013) não foi totalmente validado, tendo apenas aplicação qualitativa. Já o método descrito por Dasenaki *et al.* (2015) inclui um demorado preparo de amostras (> 12 horas) e os demais métodos deixam de contemplar algumas classes farmacológicas de principal interesse para a matriz de ovo, como tetraciclina, coccidiostáticos e macrolídeos.

Desta forma, o presente trabalho visou à obtenção de um método por LC-MS/MS para confirmação e quantificação simultânea de 22 medicamentos

veterinários em ovos, contemplando oito classes farmacológicas de interesse para a matriz de ovo (tetraciclina, sulfonamidas, coccidiostáticos, macrolídeos, lincosamidas, benzimidazóis, diterpenos e diaminopirimidinas). O método proposto foi aplicado na análise de ovos produzidos no Estado do Paraná e o mesmo poderá ser implantado na rotina dos órgãos de controle sanitário, a fim de monitorar a qualidade desse alimento.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento e validação de um método analítico por LC-MS/MS para determinação de resíduos de medicamentos de uso veterinário em ovos e posterior monitoramento desses resíduos em ovos produzidos no Estado do Paraná.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolvimento e validação do método analítico, atendendo aos requisitos estabelecidos pela Comissão das Comunidades Europeias (CCE) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA);

Estabelecer as condições de extração e purificação dos analitos (resíduos de medicamentos) em amostras de ovos, utilizando a técnica de precipitação de proteínas e extração em fase sólida;

Analisar resíduos de medicamentos veterinários em ovos produzidos em granjas localizadas no Estado do Paraná, utilizando o método desenvolvido e validado.

---

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

---



### 2.1 A AVICULTURA DE POSTURA – PANORAMA NACIONAL E ESTADUAL

O ovo de galinha é um alimento rico em proteínas, minerais e vitaminas (A, D e B), oferecendo aos consumidores um balanço quase completo de nutrientes essenciais. É um ingrediente de alta importância na culinária e na indústria de alimentos. Além disso, seu baixo custo permite o consumo pela população de baixa renda (STEFANELLO, 2011).

O Brasil é um dos principais produtores mundiais de ovos. Em 2011, a produção atingiu 40.731 bilhões de unidades, cerca de 30% a mais do que em 2003. A distribuição geográfica nacional do plantel de aves poedeiras de ovos comerciais (brancos e vermelhos) em 2012 era de 50,2% na região sudeste, 20,1% na região sul, 15,7% na região nordeste, 10,3% na região centro-oeste e 3,7% na região norte (SEAB, 2013).

O Paraná está entre os cinco principais estados produtores de ovos (11,45%). Dentre as regiões paranaenses que se destacam na produção estão Apucarana (18,9%), Paranavaí (14,49%), Maringá (13,6%), Cascavel (10,8%), Francisco Beltrão (9,7%) e Curitiba (7,3%) (SEAB, 2013).

O aumento na produção de ovos visa satisfazer tanto o mercado interno quanto a demanda das exportações. No Brasil, segundo a última Pesquisa de Aquisição Alimentar Domiciliar *Per Capita* (IBGE, 2010) o consumo médio de ovo foi de aproximadamente 3,201 kg/habitante/ano. Em relação às exportações, registrou-se um crescimento de 112% em dezembro de 2014, totalizando 2,2 mil toneladas embarcadas (SNA-NEWS, 2015), demonstrando assim a importância econômica desse alimento.

### 2.2 MEDICAMENTOS UTILIZADOS NA AVICULTURA DE POSTURA NO ESTADO DO PARANÁ

O uso de medicamentos veterinários na avicultura de postura é uma prática agropecuária amplamente empregada tanto para a prevenção quanto para o

tratamento de doenças. A maioria desses medicamentos é administrada como aditivos em ração ou na água de beber (AERTS; HOGENBOOM; BRINKMAN, 1995).

Com o objetivo de conhecer os medicamentos frequentemente administrados na avicultura de postura do Estado do Paraná, os técnicos da Vigilância Sanitária aplicaram um questionário aos proprietários de 66 granjas de galinhas poedeiras, durante o período de junho a outubro de 2004 (PAMVET-PR, 2005).

No levantamento de dados, os antimicrobianos mais citados foram as quinolonas (enrofloxacina 25,8%, norfloxacina 9,7% e ciprofloxacina 2,2%), tetraciclina (oxitetraciclina 21,5%, doxiciclina 6,5% e tetraciclina 2,2%), quinoxalinas (olaquinox 15,1%), sulfonamidas (sulfaquinoxalina 6,5%), polipeptídeos (bacitracina de zinco 6,5%), penicilinas (amoxicilina 1,1%), aminoglicosídeos (apramicina 1,1%), tetraciclina associada à aminoglicosídeos (doxiciclina + gentamicina 1,1%) e quinoxalinas associadas à polipeptídeos (olaquinox + bacitracina de zinco 1,1%) (PAMVET-PR, 2005).

Para antiparasitários, os mais citados foram os benzimidazólicos (mebendazol 23,9%, flubendazol 2,8% e oxi-bendazol 2,8%), piretróides (deltrametrina 16,9%), benzofenilurétrias (fluazuron 14,1%), ionóforos (avilamicina 8,5%, narasina 4,2% e nicarbazina 2,8%), triazinas (ciromazina 8,5%), pirazinas (praziquantel 8,5%), organofosforados (azamethiphós 2,8% e diclorvós 2,8%) e coccidiostáticos (amprólio 1,4%) (PAMVET-PR, 2005).

### 2.3 RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM ALIMENTOS

A administração de um medicamento veterinário deve seguir as orientações de boas práticas, as quais estão descritas no guia *Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs* elaborado pela Organização para Alimentação e Agricultura em parceria com a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 1993).

Deficiências nas boas práticas como o desrespeito quanto à espécie alvo, dosagem, via de administração e período de carência, podem resultar no

aparecimento de resíduos (FAO/WHO, 1993). Esses resíduos são definidos como os compostos de origem e/ou seus metabólitos presentes em qualquer alimento de origem animal, assim como os resíduos de impurezas relacionadas com o medicamento veterinário correspondente (ANVISA, 2003).

A princípio, todos os produtos de origem animal deverão estar isentos de resíduos de compostos proibidos ou conter uma concentração abaixo do respectivo Limite Máximo de Resíduo (LMR), o qual é definido como a concentração máxima de resíduo tolerável no alimento e é baseado no tipo e quantidade de resíduo que não induz efeito adverso à saúde humana, considerando-se a ingestão diária aceitável (PASCHOAL *et al.*, 2008). Caso contrário, estes produtos são considerados impróprios para o consumo e deverão ser descartados.

No Brasil, é competência do Ministério da Saúde estabelecer os valores de LMR para medicamentos veterinários, e para isso foi aprovada a Resolução n. 53, de 02 de outubro de 2012 (BRASIL, 2012a). Na Tabela 1 estão listados os valores de LMR em ovo.

TABELA 1 – LIMITES MÁXIMOS DE RESÍDUOS PARA MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM OVO SEGUNDO A RDC N. 53, DE 02 DE OUTUBRO DE 2012

Grupo	Fármaco/Resíduo Marcador	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Antimicrobianos	Neomicina	500
	Eritromicina	200
	Cloranfenicol	0 <sup>b</sup>
	Tetraciclina	200 <sup>a</sup>
	Oxitetraciclina	200 <sup>a</sup>
	Clortetraciclina	200 <sup>a</sup>
Estrogênios	Dietilestilbestrol	0 <sup>b</sup>
	Dienestrol	0 <sup>b</sup>
	Hexestrol	0 <sup>b</sup>

Nota: <sup>a</sup>se refere a soma das três tetraciclinas; <sup>b</sup>não significa necessariamente proibição de uso terapêutico

Conforme pode ser observado na Tabela 1, para o ovo são poucos os fármacos veterinários para os quais há um valor de LMR estabelecido. Nesse caso, admite-se a utilização dos LMR definidos pelo *Codex Alimentarius*, Diretivas da Comissão Europeia e/ou Food and Drug Administration (FDA) (BRASIL, 1999).

### 2.4 PROGRAMAS DE MONITORAMENTO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS

Considerando que os resíduos de medicamentos em alimentos podem significar riscos à saúde pública, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Animal (PNCRC). Esse programa foi instituído pela Portaria n. 51, de 06 de maio de 1986, visando garantir a saúde do consumidor por meio do monitoramento de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes ambientais em produtos de origem animal, como carnes, leite, pescado e mel. Além disso, houve a necessidade de se adequar às regras do comércio internacional, garantindo o crescimento das exportações (BRASIL, 1999).

No intuito de complementar as ações desenvolvidas pelo MAPA, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) iniciou em 2002 o Programa Nacional de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo, o PAMVet (SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009). Esse programa foi instituído oficialmente pela Resolução n. 253, de 16 de setembro de 2003, tendo como principal objetivo a avaliação do potencial de exposição do consumidor a resíduos de medicamentos veterinários pela ingestão de alimentos de origem animal adquiridos no comércio, como leite, carne, pescado, ovos e mel (ANVISA, 2003).

O PAMVet realizou até o momento somente análises em amostras de leite. No último relatório, referente ao período 2006/2007, foi detectada a presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas e anfenicóis. Com exceção dos anfenicóis, para os outros antimicrobianos detectados os resíduos estavam abaixo do LMR. Além disso, os resultados indicaram o uso indevido de ivermectina, visto que acima de 40% das amostras ( $n \geq 600$ ) apresentava resíduos desse medicamento (ANVISA, 2009).

Por outro lado, o PNCRC tem realizado anualmente o monitoramento de resíduos em várias matrizes de diferentes categorias animal, como suína (músculo e fígado), bovina (rim, músculo, urina e leite), frango (músculo e gordura), abelhas (mel) e galinhas (ovos). Nos resultados divulgados pelo PNCRC/2014 a maioria das amostras apresentou níveis satisfatórios, com baixo índice de resíduos. Para ovos

somente 1% das amostras (n=102) apresentaram resíduos de enrofloxacin (substância de uso não recomendado na avicultura de postura) (BRASIL, 2015).

Paralelo às atividades do MAPA e da ANVISA, o Brasil, no ano de 2005, recebeu a visita da Missão Europeia, que realiza a avaliação do controle de resíduos e contaminantes em animais vivos e produtos de origem animal, tendo em vista o interesse dos países europeus na importação desses produtos. Essa avaliação foi baseada nos padrões estabelecidos pela Diretiva 96/23/CE (CEE, 1996), que define as medidas de controle relativas às substâncias e as divide em dois grandes grupos:

- Grupo A, que compreende as substâncias com efeito anabolizante e substâncias não autorizadas (estilbenos, agentes antitireóideos, esteroides, lactonas do ácido resorcílico,  $\beta$ -agonistas, nitroimidazóis e nitrofuranos);
- Grupo B, que abrange medicamentos veterinários e outros compostos (antibióticos, anti-helmínticos, coccidiostáticos, carbamatos e piretróides, tranquilizantes, anti-inflamatórios não esteroidais, organoclorados, organofosforados, elementos químicos, micotoxinas, corantes e outros).

O relatório apresentado para a avaliação realizada nesse período, em 2005, constatou inúmeras deficiências, como a ausência de um plano de resíduos para mel, a exportação de ovos apesar da ausência de um plano para análise de resíduos, a exportação de carne de porco em desacordo com as exigências sanitárias da União Europeia e ainda falhas no sistema da qualidade e dificuldades de implantação de metodologias analíticas nos laboratórios que compõem a rede oficial do MAPA (EC, 2005; SPISSO; NÓBREGA; MARQUES, 2009).

Após essa visita foram adotadas várias medidas no sentido de suprir as deficiências e desenvolver melhorias. No último relatório apresentado, referente à inspeção de 2013, concluiu-se que o PNCRC estava em conformidade com a Diretiva 96/23/EC, pois o sistema em vigor garante que as amostras serão analisadas em laboratórios acreditados pela ISO 17025 e que os resultados obtidos sejam confiáveis. No entanto, criticou-se o uso irrestrito de medicamentos na prática veterinária, o qual pode enfraquecer as garantias dadas pelo PNCRC (EC, 2014).

Segundo Spisso, Nóbrega e Marques (2009, p. 2102)

É óbvio que os motivos técnicos alegados pelos países importadores também são usados como barreiras protecionistas a seus mercados. Entretanto, é fato que os avanços no sentido de minimizar as deficiências têm sido alavancados por forte pressão das autoridades sanitárias dos países importadores, principalmente da UE, incluindo até mesmo o embargo de produtos brasileiros, como aconteceu com o mel em 2006. Há que se reconhecer os grandes esforços e avanços alcançados pelo MAPA nos últimos anos no que diz respeito aos sistemas de gestão da segurança de alimentos de origem animal.

### 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS DE USO VETERINÁRIO EM OVOS

A grande variedade de medicamentos veterinários utilizada na avicultura de postura pode levar à presença de vários resíduos no ovo. Desta maneira, o desenvolvimento de métodos para análise de multirresíduos em ovo tem se tornado cada vez mais importante, em especial para os laboratórios das agências fiscalizadoras.

A análise de resíduos de medicamentos veterinários em ovo tem sido feita principalmente por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando detector ultravioleta (UV), arranjo de diodos (DAD) ou fluorescência (FLU) e, mais recentemente, acoplado à espectrometria de massas (MS).

#### 2.5.1 Métodos por HPLC-UV, HPLC-DAD e HPLC-FLU para determinação de resíduos de medicamentos em ovos

A revisão da literatura evidenciou vários métodos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em ovos, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC-UV), com arranjo de diodos (HPLC-DAD) e com fluorescência (HPLC-FLU).

A maioria desses métodos concentra apenas uma classe farmacológica; diaminopirimidina (NAGATA *et al.*, 1991), nitrofuranos (DRAISCI *et al.*, 1997), tetraciclina (CROUBELS; VANOOSTHUYZE; VANPETEGHEM, 1997; COOPER *et al.*, 1998; DE RUYCK *et al.*, 1999; ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000; NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008; JING *et al.*, 2011), nitroimidazóis (SAMS *et al.*, 1998), coccidiostáticos (MATABUDUL; CROSBY; SUMAR, 1999; DOWLING; O'KEEFFE; SMYTH, 2005; NASR; SHALAN; BELAL, 2013), sulfonamidas (SHAIKH; RUMMEL; DONOGHUE, 1999; FURUSAWA, 2002; HELLER *et al.*, 2002; FURUSAWA, 2003; ZOTOU; VASILIADOU, 2010; TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2011; MEHTABUDDIN *et al.*, 2012), quinolonas (GIGOSOS *et al.*, 2000; VERDON *et al.*, 2005; CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007; HASSOUAN *et al.*, 2007; JIMENEZ; COMPANYO; GUITERAS, 2011; RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2011; TAKEDA; GOTOH; MATSUOKA, 2011; STOILOVA; SURLEVA; STOEV, 2013), fluorquinolonas (MAXWELL; COHEN; DONOGHUE, 1999; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2000; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2003; SHIM *et al.*, 2003; ZENG *et al.*, 2005; HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007; SUMMA *et al.*, 2015), benzimidazóis (BISTOLETTI *et al.*, 2011), ionóforos (MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000), avermectinas (GIANNETTI *et al.*, 2011), anfenicóis (XIE *et al.*, 2011) e penicilinas (XIE *et al.*, 2012).

Dentre os métodos pesquisados somente quatro contemplam duas classes farmacológicas; sulfonamidas e diaminopirimidina (DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008); fluorquinolonas e quinolonas (ROSE; BYGRAVE; STUBBINGS, 1998; CHO *et al.*, 2010; GAJDA *et al.*, 2012).

Um importante aspecto a ser considerado é que esses métodos apresentam moderada sensibilidade e seletividade para matrizes complexas como o ovo, exigindo longas corridas cromatográficas para uma separação adequada dos analitos. Além disso, métodos por HPLC-FLU necessitam muitas vezes de uma etapa de derivatização, o que torna o preparo da amostra demorado e laborioso.

De modo geral, qualquer método analítico necessita de um preparo adequado de amostra. Para os métodos citados anteriormente, a técnica de precipitação de proteínas com acetonitrila é uma das mais utilizadas para a limpeza da amostra (NAGATA *et al.*, 1991; DRAISCI *et al.*, 1997; ROSE; BYGRAVE;



STUBBINGS, 1998; SAMS *et al.*, 1998; DE RUYCK *et al.*, 1999; MAXWELL; COHEN; DONOGHUE, 1999; SHAIKH; RUMMEL; DONOGHUE, 1999; HELLER *et al.*, 2002; DOWLING; O'KEEFFE; SMYTH, 2005; CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007; MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000; HASSOUAN *et al.*, 2007; DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008; BISTOLETTI *et al.*, 2011; GIANNETTI *et al.*, 2011; GAJDA *et al.*, 2012; XIE *et al.*, 2012; STOILOVA; SURLEVA; STOEV, 2013). No entanto, outros solventes como acetato de etila (COOPER *et al.*, 1998; TOLIKÁ; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2011), ácido clorídrico (GIGOSOS *et al.*, 2000), ácido perclórico (FURUSAWA, 2003), ácido trifluoracético (NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008), etanol/água (FURUSAWA, 2002), metanol (CROUBELS; VANOOSTHUYZE; VANPETEGHEM, 1997), metanol/acetonitrila (TAKEDA; GOTOH; MATSUOKA, 2011), acetonitrila/amônia (SCHNEIDER; DONOGHUE, 2000; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2003), acetonitrila/água (XIE *et al.*, 2011), acetonitrila/ácido tricloroacético (CHO *et al.*, 2010), acetonitrila/ácido fosfórico (ZOTOU; VASILADOU, 2010), ácido tricloroacético (VERDON *et al.*, 2005), etanol/ácido acético (ZENG *et al.*, 2005) e lauril sulfato de sódio (RAMBLA-ALEGRE *et al.*, 2011; NASR; SHALAN; BELAL, 2013) também são empregados.

Em alguns casos, uma segunda etapa de *clean-up* é realizada com extração em fase sólida (SPE), de modo a concentrar os analitos presentes na amostra e eliminar interferentes (NAGATA *et al.*, 1991; ROSE; BYGRAVE; STUBBINGS, 1998; SAMS *et al.*, 1998; GIGOSOS *et al.*, 2000; HELLER *et al.*, 2002; CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007; NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008; ZOTOU; VASILADOU, 2010; TAKEDA; GOTOH; MATSUOKA, 2011; TOLIKÁ; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2011; STOILOVA; SURLEVA; STOEV, 2013). Também se utiliza a extração líquido-líquido com solventes como hexano, éter etílico e/ou diclorometano, tanto para aumentar a eficiência da extração quanto para reduzir a quantidade de gordura da amostra (DRAISCI *et al.*, 1997; DE RUYCK *et al.*, 1999; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2000; SCHNEIDER; DONOGHUE, 2003; DOWLING; O'KEEFFE; SMYTH, 2005; ZENG *et al.*, 2005; HASSOUAN *et al.*, 2007; CHO *et al.*, 2010; GIANNETTI *et al.*, 2011; XIE *et al.*, 2011; MEHTABUDDIN *et al.*, 2012).



Técnicas diferenciadas também são utilizadas como extração por fluido supercrítico (MATABUDUL; CROSBY; SUMAR, 1999; SHIM *et al.*, 2003), SPE *on-line* com equipamento para enriquecimento sequencial automático de traços de dialisados (ASTED) (ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000), SPE utilizando polímeros de impressão molecular (JING *et al.*, 2011) e extração por líquido pressurizado (HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007; JIMENEZ; COMPANYO; GUITERAS, 2011).

Os principais parâmetros desses métodos analíticos estão descritos nos Anexos 1 e 2.

### 2.5.2 Métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para determinação de resíduos de medicamentos em ovos

Atualmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, tornou-se a técnica de escolha para análise de resíduos de medicamentos em alimentos, pois proporciona uma maior seletividade e sensibilidade quando comparada aos métodos por HPLC com detecção convencional. A grande vantagem do seu uso é o da análise sequencial, também conhecida como espectrometria de massas sequencial (MS/MS), que além de favorecer a elucidação estrutural da molécula oferece seletividade, uma vez que os íons fragmentos formados são característicos para cada composto (DOOLEY, 2003; EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009). Além disso, cumpre com os requisitos exigidos pela Diretiva 2002/657/EC da Comunidade Europeia, pois combina a separação dos analitos com informações estruturais, fornecendo uma detecção e confirmação inequívoca de uma substância, possibilitando o desenvolvimento de métodos confiáveis (AERTS; HOGENBOOM; BRINKMAN, 1995; KENNEDY *et al.*, 1998).

A tendência dos métodos analíticos publicados recentemente é a de determinar simultaneamente o maior número possível de compostos nas mais diversas matrizes alimentícias, melhorando assim a relação custo-benefício. Entretanto, existem poucos métodos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas para análise de resíduos de medicamentos de diferentes

classes farmacológicas em ovos. Dentre os 77 artigos pesquisados todos são multianalito, porém apenas 15 agregam mais de uma classe farmacológica (HELLER; NOCHETTO, 2004; HELLER *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2008; MOL, H. G. J. *et al.*, 2008; PETERS *et al.*, 2009; FRENICH *et al.*, 2010; SPISSO *et al.*, 2010; DENG *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2011; CAPRIOTTI *et al.*, 2012; GAJDA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; NAKAJIMA *et al.*, 2012; ROBERT *et al.*, 2013; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015).

Os métodos publicados por Mol *et al.* (2008), Peters *et al.* (2009) e Deng *et al.* (2011), utilizam a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas de tempo de voo (TOF-MS) para monitorar centenas de compostos em ovos e outras matrizes de alimentos. No entanto, de acordo com a Diretiva 2002/657/EC da Comunidade Europeia, os métodos baseados em TOF-MS são adequados apenas para análises de triagem e não para fins de confirmação.

O método desenvolvido por Robert *et al.* (2013) não foi totalmente validado de acordo com a Diretiva 2002/657/EC da Comunidade Europeia, tendo apenas aplicação qualitativa. Já o método descrito por Dasenaki *et al.* (2015) contempla mais de 20 classes farmacológicas, entretanto inclui um demorado preparo de amostras, o qual necessita que o extrato permaneça sob refrigeração por 12 horas antes da etapa final de limpeza.

Os demais métodos citados, apesar de agregarem várias classes, deixam de contemplar aquelas de principal interesse para a matriz de ovo, como tetraciclina (HELLER; NOCHETTO, 2004; SPISSO *et al.*, 2010; GAJDA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; NAKAJIMA *et al.*, 2012), coccidiostáticos (HELLER *et al.*, 2006; JIA *et al.*, 2008; FRENICH *et al.*, 2010; JIMENEZ *et al.*, 2011) e macrolídeos (CAPRIOTTI *et al.*, 2012).

Uma das etapas mais laboriosas durante o desenvolvimento de um método para análise de diversos resíduos consiste no preparo da amostra, pois as diferenças nas propriedades físico-químicas dos analitos torna o processo de extração e limpeza bastante desafiador. Em virtude disso, diferentes estratégias têm sido utilizadas para extrair os analitos e promover uma efetiva limpeza da amostra. Observa-se que a precipitação de proteínas com acetonitrila é uma das técnicas mais empregadas (SAMS *et al.*, 1998; MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000; MATABUDUL *et al.*, 2001; YAKKUNDI *et al.*, 2001; HELLER *et al.*, 2002;

MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002; MORTIER; DAESELEIRE; DELAHAUT, 2003; SCZESNY; NAU; HAMSCHER, 2003; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; HELLER; NOCHETTO, 2004; MORTIER *et al.*, 2004; MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005a; b; PENNEY *et al.*, 2005; WANG; LEUNG; BUTTERWORTH, 2005; HAMSCHER *et al.*, 2006; MOTTIER *et al.*, 2006; ROKKA; PELTONEN, 2006; RONNING; EINARSEN; ASP, 2006; XIA *et al.*, 2006; TAMOSIUNAS; PADARAUSKAS, 2007; WANG; LEUNG, 2007; BOGIALLI; CIAMPANELLA; *et al.*, 2009; CRONLY *et al.*, 2009; DUBREIL-CHENEAU *et al.*, 2009; SHAO *et al.*, 2009; FRENICH *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; MITROWSKA; POSYNIK; ZMUDZKI, 2010; SPISSO *et al.*, 2010; DE LA CRUZ *et al.*, 2011; DMITROVIC; DURDEN, 2011; GALARINI *et al.*, 2011; GAJDA *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2012; MOLONEY *et al.*, 2012; TOLGYESI; FEKETE; *et al.*, 2012; TOLGYESI; SHARMA; *et al.*, 2012; ROBERT *et al.*, 2013).

Além da acetonitrila, outros solventes e misturas são utilizados como acetonitrila/ácido acético (DURDEN; MACPHERSON, 2007), acetonitrila/ácido fórmico (MOL, H. G. J. *et al.*, 2008; DENG *et al.*, 2011; NAKAJIMA *et al.*, 2012), acetonitrila/água (PETERS *et al.*, 2009; NAKAJIMA *et al.*, 2012), acetonitrila/metanol (DASENAKI; THOMAIDIS, 2015), acetonitrila/tetra-hidrofurano (HORMAZABAL; YNDESTAD; OSTENSVIK, 2003), metanol (ROSEN, 2001; CUI *et al.*, 2006; ZENG *et al.*, 2013), metanol/água/ácido acético (CAPRIOTTI *et al.*, 2012), acetato de etila (DE RUYCK *et al.*, 2001; FINZI *et al.*, 2005; AI *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012), diclorometano/acetona (FORTI; SCORTICHINI, 2009), acetona/tetra-hidrofurano (HORMAZABAL; YNDESTAD, 2000), tolueno (CANNAVAN; KENNEDY, 1997), água (CAVALIERE *et al.*, 2002), água/EDTA (BRUNO *et al.*, 2002), solução de fosfato (SIQUEIRA *et al.*, 2009; HU; WANG; FENG, 2010; TAO *et al.*, 2012), tampão fosfato (SHEN *et al.*, 2008), tampão succinato de sódio (HELLER *et al.*, 2006), tampão Tetrasensor® (ALFREDSSON *et al.*, 2005), tampão Tris (DUBOIS *et al.*, 2001) e tampão EDTA/McIlvaine (NAKAZAWA *et al.*, 1999; JIA *et al.*, 2008).

Alguns autores também utilizam a extração líquido-líquido (ELL) com éter, hexano e/ou diclorometano para extrair os analitos da amostra (HORMAZABAL; YNDESTAD, 2000; HORMAZABAL; YNDESTAD; OSTENSVIK, 2003).

Após a etapa de extração, normalmente se realiza uma segunda etapa, a de limpeza (*clean-up*), a qual faz uso da ELL e da extração em fase sólida (SPE).

No intuito de remover gorduras, costuma se utilizar a ELL com hexano (DE RUYCK *et al.*, 2001; MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005b; PENNEY *et al.*, 2005; WANG; LEUNG; BUTTERWORTH, 2005; CUI *et al.*, 2006; DURDEN; MACPHERSON, 2007; TAMOSIUNAS; PADARAUSKAS, 2007; WANG; LEUNG, 2007; SHEN *et al.*, 2008; CRONLY *et al.*, 2009; GALARINI *et al.*, 2011; BARBOSA *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2012; DASENAKI; THOMAIDIS, 2015).

A fim de concentrar os analitos, remover interferentes e reduzir o efeito matriz, utiliza-se com frequência a SPE (CANNAVAN; KENNEDY, 1997; SAMS *et al.*, 1998; NAKAZAWA *et al.*, 1999; HORMAZABAL; YNDESTAD, 2000; DUBOIS *et al.*, 2001; MATABUDUL *et al.*, 2001; ROSEN, 2001; BRUNO *et al.*, 2002; CAVALIERE *et al.*, 2002; HELLER *et al.*, 2002; MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002; DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004; HELLER; NOCHETTO, 2004; WANG; LEUNG; BUTTERWORTH, 2005; CUI *et al.*, 2006; DE LA CALLE; SZILAGYI, 2006; MOTTIER *et al.*, 2006; ROKKA; PELTONEN, 2006; SZILAGYI; DE LA CALLE, 2006; DURDEN; MACPHERSON, 2007; TAMOSIUNAS; PADARAUSKAS, 2007; WANG; LEUNG, 2007; JIA *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2008; FORTI; SCORTICHINI, 2009; PETERS *et al.*, 2009; STASTNY *et al.*, 2009; FRENICH *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010; LU *et al.*, 2010; MITROWSKA; POSYNIK; ZMUDZKI, 2010; DE LA CRUZ *et al.*, 2011; DENG *et al.*, 2011; DMITROVIC; DURDEN, 2011; GALARINI *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; TAO *et al.*, 2012; TOLGYESI; FEKETE; *et al.*, 2012; TOLGYESI; SHARMA; *et al.*, 2012). Dentre os cartuchos mais utilizados se destaca o Oasis HLB®, o qual é indicado para substâncias ácidas, básicas e neutras, de média a alta polaridade (WATERS, 2015).

Técnicas diferenciadas como SPE *on-line* com equipamento para enriquecimento sequencial automático de traços de dialisados (ASTED) (ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000), matriz de dispersão em fase sólida (MSPD) (BOGIALLI *et al.*, 2003; BOGIALLI; D'ASCENZO; *et al.*, 2009), extração por líquido pressurizado (PLE) (JIMENEZ; COMPANYO; GUITERAS, 2011), diálise (LOLO *et al.*, 2005) e ainda hidrólise e derivatização (DE LA CALLE; SZILAGYI, 2006; SZILAGYI; DE LA CALLE, 2006; BOCK; STACHEL; GOWIK, 2007; STASTNY *et al.*, 2009) também são utilizadas.

Os principais parâmetros desses métodos analíticos estão descritos no Anexo 3.

### 2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

A validação consiste em um processo pelo qual estudos estatísticos são utilizados com a finalidade de garantir que o método avaliado atende às exigências desejadas, comprovando que é adequado e confiável para o qual é proposto (GIL; BATISTA FILHO, 2007).

No caso de métodos analíticos para análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos, o mesmo só será considerado validado se forem avaliados os seguintes requisitos: seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão, capacidade de detecção, linearidade, efeito matriz, efeito residual, recuperação, precisão, exatidão, robustez e estabilidade (CCE, 2002; BRASIL, 2012b).

#### 2.6.1 Seletividade

Entende-se por seletividade, a capacidade que um método analítico possui em distinguir a substância a analisar de outras substâncias presentes na matriz, tais como isômeros, metabólitos, produtos de degradação, substâncias endógenas, componentes da matriz, etc (CCE, 2002).

A seletividade, segundo a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002) pode ser avaliada através da análise de um número adequado de amostras em branco (isentas dos analitos de interesse), no mínimo 20, e verificar as possíveis interferências na região de eluição da substância a analisar.

### 2.6.2 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O limite de detecção pode ser determinado de diversas formas, como a relação sinal/ruído (igual ou superior a 3:1), desvio padrão da resposta, do coeficiente angular, método visual e modelos estatísticos, desde que sejam estabelecidos critérios de aceitabilidade e comprovado com certo limite de confiança aceitável (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

### 2.6.3 Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais aceitáveis (BRASIL, 2003). Ele pode ser determinado de diversas formas, como relação sinal/ruído (superior a 10:1), desvio padrão da média do branco, estimativa do desvio padrão da resposta próximo ao LQ e método visual, desde que sejam respeitados os critérios de aceitabilidade (BRASIL, 2003).

### 2.6.4 Limite de decisão

O limite de decisão ( $CC_{\alpha}$ ) é definido como o limite a partir do qual se pode concluir que uma amostra é não conforme com uma probabilidade de erro alfa (CCE, 2002).

No caso de substâncias para as quais não se encontre definido um valor de limite máximo de resíduo (LMR), o  $CC_{\alpha}$  pode ser estabelecido pela curva de calibração, na qual o limite de decisão é igual à concentração correspondente à

ordenada na origem mais 2,33 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial. Também pode ser utilizado o valor do limite de detecção da substância de interesse (três vezes a razão sinal/ruído), através da análise de 20 amostras em branco fortificadas (CCE, 2002).

Para as substâncias com um LMR permitido, o  $CC\alpha$  pode ser definido pela curva de calibração. Neste caso, deve usar-se material em branco, fortificado em redor do limite permitido em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. O limite de decisão ( $\alpha=5\%$ ) é igual à concentração correspondente ao limite permitido mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial (Equação 1). Também pode ser definido através da análise de pelo menos 20 brancos fortificados com a ou as substâncias a analisar no limite permitido. O limite de decisão ( $\alpha=5\%$ ) é igual à concentração ao limite permitido mais 1,64 vezes o correspondente desvio padrão (CCE, 2002).

$$CC\alpha = LMR + 1,64 \times DP \quad \text{Equação (1)}$$

### 2.6.5 Capacidade de detecção

A capacidade de detecção ( $CC\beta$ ) é definida como o teor mais baixo de substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado numa amostra com uma probabilidade de erro beta. Em caso de substâncias relativamente às quais não se encontre definido um limite permitido, a capacidade de detecção é a concentração mais baixa a que o método é capaz de detectar amostras realmente contaminadas com uma certeza estatística de  $1 - \beta$ . No caso de substâncias com um limite permitido estabelecido, isto significa que a capacidade de detecção é a concentração a que o método é capaz de detectar concentrações no limite permitido com uma certeza estatística de  $1 - \beta$  (CCE, 2002).

No caso de substâncias para as quais não se encontre definido um valor de limite máximo de resíduo (LMR), a  $CC\beta$  pode ser definida pela curva de calibração. Neste caso, deve ser utilizado um branco, fortificado ao nível mínimo de

desempenho requerido (teor mínimo detectável) e abaixo desse nível em passos equidistantes. Analisar as amostras. Após a identificação, representar graficamente o sinal em função da concentração adicionada. A capacidade de detecção ( $\beta=5\%$ ) é igual à concentração correspondente ao limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor médio medido no limite de decisão.

Para as substâncias com um LMR permitido, a  $CC\beta$  pode ser definida pela curva de calibração. Neste caso, deve ser utilizado um branco, fortificado em redor do limite permitido em passos equidistantes. Analisar as amostras e identificar a ou as substâncias. Calcular o desvio padrão do teor médio medido no limite de decisão. A capacidade de detecção ( $\beta=5\%$ ) é igual à concentração correspondente ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial.

Para ambas as substâncias, a capacidade de detecção também pode ser definida através da análise de pelo menos 20 brancos fortificados com a ou as substâncias a analisar no limite de decisão ( $CC\alpha$ ). A capacidade de detecção ( $\beta=5\%$ ) é igual ao valor do limite de decisão mais 1,64 vezes o desvio padrão da reprodutibilidade intralaboratorial do teor medido (Equação 2) (CCE, 2002).

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \times DP \quad \text{Equação (2)}$$

### 2.6.6 Linearidade

Linearidade é definida como a capacidade de um método analítico em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa especificada (BRASIL, 2003). A verificação da linearidade na curva de calibração é importante para o desempenho do método analítico, pois ela afeta a aplicabilidade, a precisão e a exatidão.



Segundo a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a curva de calibração deve:

- Ser construída com, pelo menos, cinco níveis (incluindo o zero);
- Deve indicar a equação da curva e o grau de ajuste dos dados;
- Devem ser mencionados os intervalos de aceitabilidade dos parâmetros da curva.

A RDC 27, de 12 de maio de 2012 (BRASIL, 2012b) estabelece que os desvios de precisão e exatidão sejam inferiores ou iguais a 15% para cada nível de concentração, exceto para o nível referente ao limite inferior de quantificação, que pode ser de no máximo 20%.

O coeficiente de correlação ( $r$ ) é frequentemente utilizado para indicar o quanto um modelo é linear. A ANVISA estipula um valor de 0,99 para métodos analíticos e de 0,98 para bioanalíticos (BRASIL, 2003). Porém, apesar de ser amplamente empregado como indicação de linearidade, é interpretado equivocadamente como parâmetro de linearidade, portanto não deve ser utilizado isoladamente. O INMETRO (INMETRO, 2003) sugere que a adequação da linearidade seja avaliada por meios estatísticos.

### 2.6.7 Efeito matriz

O efeito matriz é definido como o efeito na resposta do analito ou padrão interno causado por componentes da matriz biológica (BRASIL, 2012b).

Segundo a RDC n. 27, de 12 de maio de 2012 (BRASIL, 2012b), o estudo do efeito matriz deve ser realizado da seguinte maneira:

Devem ser analisadas amostras de matrizes biológicas processadas, posteriormente adicionadas de analito e padrão interno (PI), e soluções, nas mesmas concentrações das amostras (concentração baixa e concentração alta).

Para cada amostra deve ser obtido o fator de matriz normalizado por padrão interno (FMN), conforme a Equação 3:

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/Resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/Resposta do PI em solução}} \quad \text{Equação (3)}$$

O coeficiente de variação (CV%) dos FMNs relativos a todas as amostras deve ser inferior a 15%.

### 2.6.8 Efeito residual

O efeito residual é definido como o efeito gerado pelo aparecimento ou aumento do sinal do analito ou padrão interno devido à contaminação proveniente de amostras analisadas anteriormente (BRASIL, 2012b).

Devem ser realizadas, no mínimo, três injeções da mesma amostra branco, sendo uma antes e duas logo após a injeção de uma ou mais amostras processadas com o maior nível de concentração da curva de calibração (BRASIL, 2012b).

As respostas de picos interferentes no tempo de retenção do analito devem ser inferiores a 20% da resposta do analito nas amostras de menor nível de concentração e 5% da resposta dos padrões internos (BRASIL, 2012b).

### 2.6.9 Recuperação (Eficiência da extração)

A recuperação de uma substância a analisar em um ensaio é definida como a eficiência da extração, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de amostras em branco fortificadas com o padrão e submetidas ao processo de extração, com os resultados analíticos de padrão não extraído (BRASIL, 2003).

Segundo a RDC n. 899, de 29 de maio de 2003, o estudo da recuperação deve ser realizado da seguinte maneira:

- Fortificar amostras em branco em três concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de linearidade do método, antes e após o processo de extração;
- Calcular a área dos analitos e padrões internos (PI) extraídos e não extraídos, separadamente.

O cálculo da recuperação é apresentado na Equação 4:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Área do analito ou PI extraído}}{\text{Área do analito ou PI não extraído}} \times 100 \quad \text{Equação (4)}$$

### 2.6.10 Precisão

A precisão é avaliada como a proximidade dos resultados repetidos de amostras semelhantes ou padrões, utilizando certas condições definidas (BRASIL, 2012b). É representada por meio da repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial ou ainda pela reprodutibilidade interlaboratorial, sendo usualmente expressa pelo coeficiente de variação (CV%).

#### 2.6.10.1 Repetibilidade

A repetibilidade representa o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, sob as mesmas condições analíticas. Devem ser usados os mesmos procedimentos de medição, analista, local e repetições em um curto espaço de tempo (CCE, 2002).

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a repetibilidade do método é verificada da seguinte maneira:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite máximo de resíduo (LMR). Para substâncias com valores definidos de limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) com 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo.
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%);
- Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes;
- Calcular a concentração média global e o coeficiente de variação (CV%).

### 2.6.10.2 Reprodutibilidade intralaboratorial

É a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes ou equipamentos diferentes (CCE, 2002).

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a reprodutibilidade intralaboratorial do método é verificada da seguinte maneira:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite máximo de resíduo (LMR). Para substâncias com valores definidos de limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) com 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo.
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%);
- Repetir estes passos pelo menos mais duas vezes;
- Calcular a concentração média global e o coeficiente de variação (CV%).

Segundo as orientações da Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), o coeficiente de variação (CV%), em condições de reprodutibilidade, não deve exceder o nível calculado através da Equação de Horwitz (Equação 5).

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \times \log C)} \quad \text{Equação (5)}$$

Na equação, C é a concentração expressa sob a forma de uma potência de 10 (por exemplo, 1 mg/g =  $10^{-3}$ ). Na Tabela 2, são listados alguns exemplos dos coeficientes de variação.

TABELA 2 – EXEMPLOS DE COEFICIENTES DE VARIAÇÃO EM CONDIÇÕES DE REPRODUTIBILIDADE PARA MÉTODOS QUANTITATIVOS

Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Coeficiente de variação (CV%)
1	(*)
10	(*)
100	23
1000	16

(\*) Para concentrações inferiores a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a aplicação da equação de Horwitz resulta em valores inaceitavelmente elevados, por conseguinte, os desvios padrões relativos abaixo de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  devem ser os mais baixos possíveis.

No que diz respeito às análises em condições de repetibilidade, o CV intralaboratorial deve situar-se entre metade e dois terços dos valores supra-referidos na Tabela 2 (CCE, 2002).

### 2.6.11 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados obtidos pelo método em relação ao valor verdadeiro. Os processos normalmente utilizados para avaliar a exatidão são através de materiais de referência certificados (MRC), comparações interlaboratoriais e testes de recuperação (CCE, 2002).

### 2.6.11.1 Veracidade

Os materiais de referência certificados (MRC) devem ser utilizados na determinação da veracidade, um dos componentes da exatidão do método analítico. Este material possui um valor de concentração certificado com uma incerteza associada e um nível de confiança estabelecido, sendo indispensável que ele seja fornecido por órgãos reconhecidos e confiáveis (CCE, 2002).

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a veracidade é verificada da seguinte maneira:

- Analisar seis amostras idênticas do MRC em conformidade com as instruções do método;
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV%);
- Calcular a veracidade dividindo a concentração média detectada pelo valor certificado e multiplicar o valor obtido por 100, para obter a porcentagem.

A veracidade é calculada conforme demonstrado na Equação 6:

$$\text{Veracidade (\%)} = \frac{\text{Concentração média detectada}}{\text{Valor certificado}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Os intervalos indicados para os desvios entre o valor médio da concentração determinada experimentalmente (corrigida pela recuperação ou sem correção se os cálculos são baseados na curva de calibração obtida com a matriz) e o valor certificado são apresentados na Tabela 3 (CCE, 2002).

TABELA 3 – VERACIDADE MÍNIMA DE MÉTODOS QUANTITATIVOS

Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Intervalo
$\leq 1$	-50% a +20%
> 1 a 10	-30% a +10%
> 10	-20% a +10%

### 2.6.11.2 Exatidão (Ensaio de recuperação)

Quando não esteja disponível um MRC, a exatidão deverá ser calculada através da recuperação da substância de interesse adicionada a uma matriz em branco (CCE, 2002).

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a exatidão do método é verificada da seguinte maneira:

- Selecionar 18 alíquotas de um material em branco e fortificar três grupos de seis alíquotas nas concentrações de 0,5, 1 e 1,5 vezes o limite máximo de resíduo (LMR). Para substâncias com valores definidos de limite mínimo de desempenho requerido (LMDR) com 1, 1,5 e 2 vezes o limite mínimo.
- Determinar a concentração da substância em cada uma das amostras;
- Calcular a recuperação média e o coeficiente de variação (CV%);

A exatidão é calculada através da Equação 7:

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{Teor medido}}{\text{Nível de fortificação}} \times 100 \quad \text{Equação (7)}$$

Os intervalos indicativos para os valores médios das concentrações determinadas experimentalmente (corrigidas pela recuperação ou sem correção se os cálculos são realizados baseados na curva obtida com a matriz) são os mesmos descritos na Tabela 3.

### 2.6.12 Robustez

A robustez é definida como a susceptibilidade de um método analítico a alterações das condições experimentais. Relativamente a todas as condições experimentais que possam na prática estar sujeitas a variações (reagentes, solventes, padrões, composição da amostra, pH, temperatura), devem ser indicadas quaisquer alterações capazes de afetar os resultados analíticos (CCE, 2002).

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a robustez deve ser conduzida da seguinte forma:

- Identificar possíveis fatores que possam influenciar os resultados;
- Realizar um teste de Youden ou outros métodos aprovados;
- Quando for verificado que um fator influencia significativamente os resultados das medições, devem realizar mais experimentos para decidir quanto ao limite de aceitabilidade deste fator.
- Os fatores que influenciam significativamente os resultados devem ser claramente identificados no protocolo do método.

### 2.6.13 Estabilidade

A estabilidade insuficiente da substância a analisar, ou dos constituintes da matriz durante o armazenamento, podem dar origem a desvios significativos no resultado da análise. Geralmente, a estabilidade da substância a analisar está bem caracterizada em várias condições de armazenamento. Entretanto, quando a estabilidade do composto a analisar não for definida, deverão ser realizados testes de estabilidade na matriz e no solvente de preparo dos padrões em condição de estocagem (CCE, 2002).



### 2.6.13.1 Estabilidade do analito em solução

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a estabilidade do analito em solução deve ser conduzida da seguinte forma:

Preparar uma solução-mãe fresca da ou das substâncias a analisar e diluir tal como especificado nas instruções da análise de modo a poder preparar alíquotas suficientes (por exemplo, 40) de cada concentração selecionada (por exemplo, próximo ao limite máximo permitido).

Medir o teor da substância a analisar na solução recentemente preparada e, posteriormente, de acordo com o plano sugerido na Tabela 4:

TABELA 4 – PLANO PARA DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE EM SOLUÇÃO

Condições	-20 °C	+4 °C	+20 °C
<b>Escuro</b>	10 alíquotas	10 alíquotas	10 alíquotas
<b>Luz</b>			10 alíquotas

O tempo de armazenamento pode ser selecionado como 1, 2, 3 e 4 semanas ou maior, por exemplo, até ao primeiro fenómeno de degradação observável durante a identificação e/ou a quantificação.

O tempo e as condições de armazenamento ótimas devem ser registrados.

O cálculo da concentração da ou das substâncias a analisar em cada alíquota deve ser efetuado considerando como 100% a solução recém-preparada.

### 2.6.13.2 Estabilidade do analito na matriz

Sempre que possível, devem ser utilizadas amostras reais. Quando isso não for possível, deve ser utilizada uma matriz fortificada com a ou as substâncias a analisar.

De acordo com a Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), a estabilidade do analito em matriz deve ser conduzida da seguinte forma:

O material em branco deve ser dividido em cinco alíquotas. Cada alíquota deve ser fortificada com a substância a analisar, preparada de preferência em uma pequena quantidade de solução aquosa. Uma alíquota deve ser analisada imediatamente. As restantes devem ser armazenadas a um mínimo de -20 °C, ou inferior, e analisadas após o período de 1, 2, 4 e 20 semanas.

O cálculo da concentração da ou das substâncias a analisar em cada alíquota deve ser efetuado considerando como 100% a amostra recém-preparada.

A porcentagem de substância a analisar restante, tanto para estabilidade em solução quanto para em matriz, é calculada conforme a Equação 8.

$$\text{Substância a analisar restante (\%)} = \frac{\text{Concentração final}}{\text{Concentração inicial}} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

---

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

### 3.1 AMOSTRAS DE OVOS

Amostras de ovos, produzidas organicamente em duas granjas localizadas no Estado do Paraná e isentas dos analitos de interesse, foram utilizadas no desenvolvimento do processo de extração e validação do método LC-MS/MS. Os ovos frescos foram quebrados e o conteúdo homogeneizado em um liquidificador (Durabrand, M.K. Eletrodomésticos Mondial LTDA, Bahia, Brasil) durante 5 minutos. Em seguida, alíquotas de 1 g foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL (TPP Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça) e estocadas a -40 °C.

### 3.2 PADRÕES ANALÍTICOS E REAGENTES

Padrões analíticos de clortetraciclina (92%), sulfamerazina deuterada (padrão interno; 98%), doxiciclina (98,7%), eritromicina (95,3%), oxitetraciclina (97,5%), sulfadiazina (99,5%), sulfadimetoxina (98%), sulfamerazina (99,2%) e sulfametoxazol (99,5%) foram obtidos da Dr. Ehrenstorfer (Bavaria, Alemanha). Cambendazol (padrão interno; 99,8%), cloridrato de demeclociclina (padrão interno; 92,3%), flubendazol (99,2%), lasalocid A sódico (92,5%), cloridrato de lincomicina (100,3%), nigericina sódica (padrão interno;  $\geq 98\%$ ), sulfacetamida (99,7%), sulfacloropiridazina (99,4%), sulfametazina (99,7%), sulfametoxipiridazina (99,8%), sulfaquinoxalina (96%), sulfatiazol (99,9%), cloridrato de tetraciclina (97,5%), tartarato de tilosina (87,9%) e trimetoprim (99,5%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Padrões de referência de narasina (86,1%) e tiamulina ( $\geq 96,5\%$ ) foram obtidos da U.S. Pharmacopeial Convention (Maryland, EUA). Nas Figuras 1 a 6 estão ilustradas as estruturas químicas dos respectivos padrões.

Acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram obtidos da Panreac Química (Catalunha, Espanha). Formiato de amônio ( $\geq 97\%$ ) foi obtido da Acros Organics (New Jersey, EUA). EDTA ( $\geq 98,5\%$ ), acetato de sódio anidro ( $\geq 99\%$ ), ácido cítrico, ácido fosfórico (85%), hidróxido de sódio (97%), fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico, fosfato de sódio dibásico anidro, acetato de amônio

(98%) e ácido acético glacial (95%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Ácido fórmico ( $\geq 98\%$ ) foi obtido da Merck (Hessen, Alemanha). Água ultrapura foi obtida utilizando um sistema de purificação Milli-Q Millipore (Massachusetts, EUA).

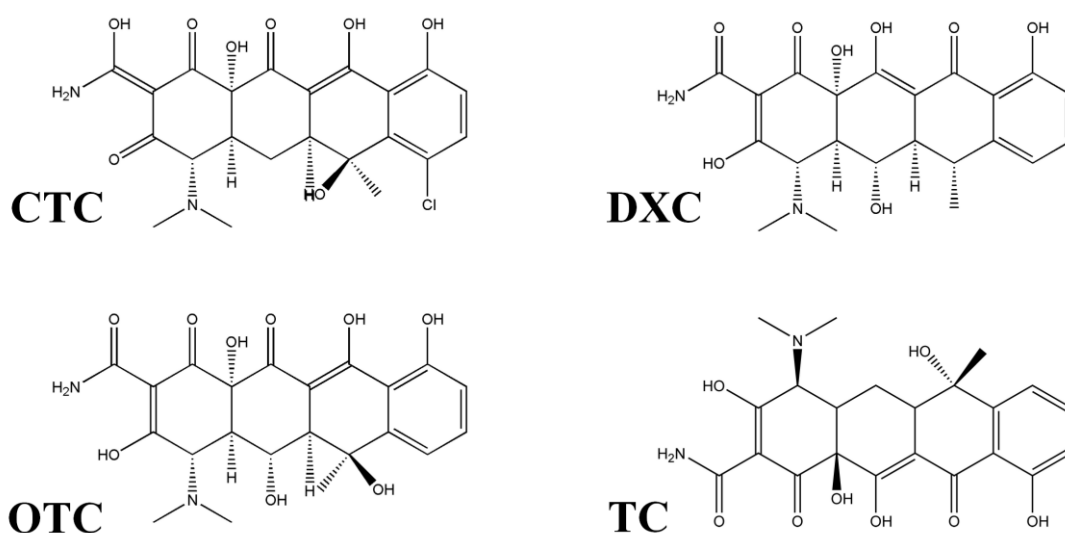


FIGURA 1 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS TETRACICLINAS

Nota: CTC: clortetraciclina, DXC: doxiciclina, OTC: oxitetraciclina e TC: tetraciclina

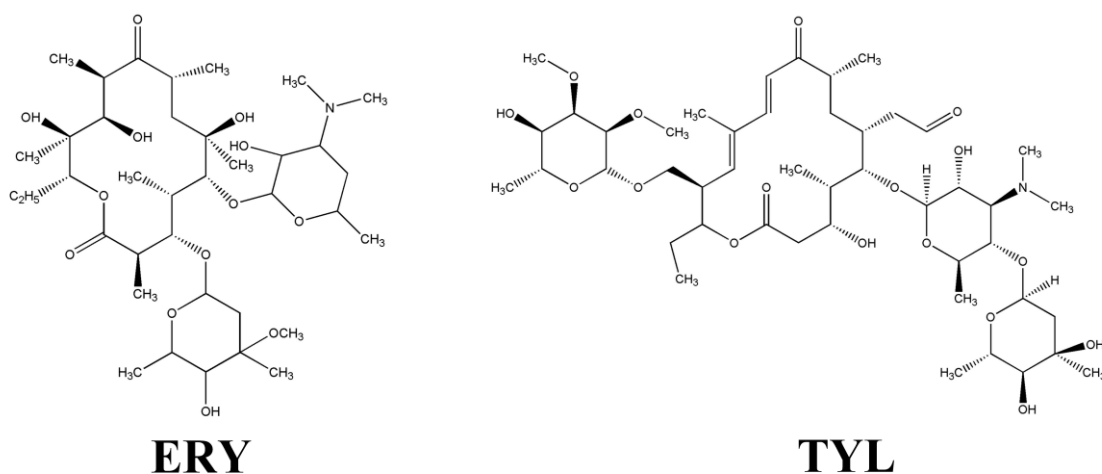


FIGURA 2 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS MACROLÍDEOS

Nota: ERY: eritromicina e TYL: tilosina

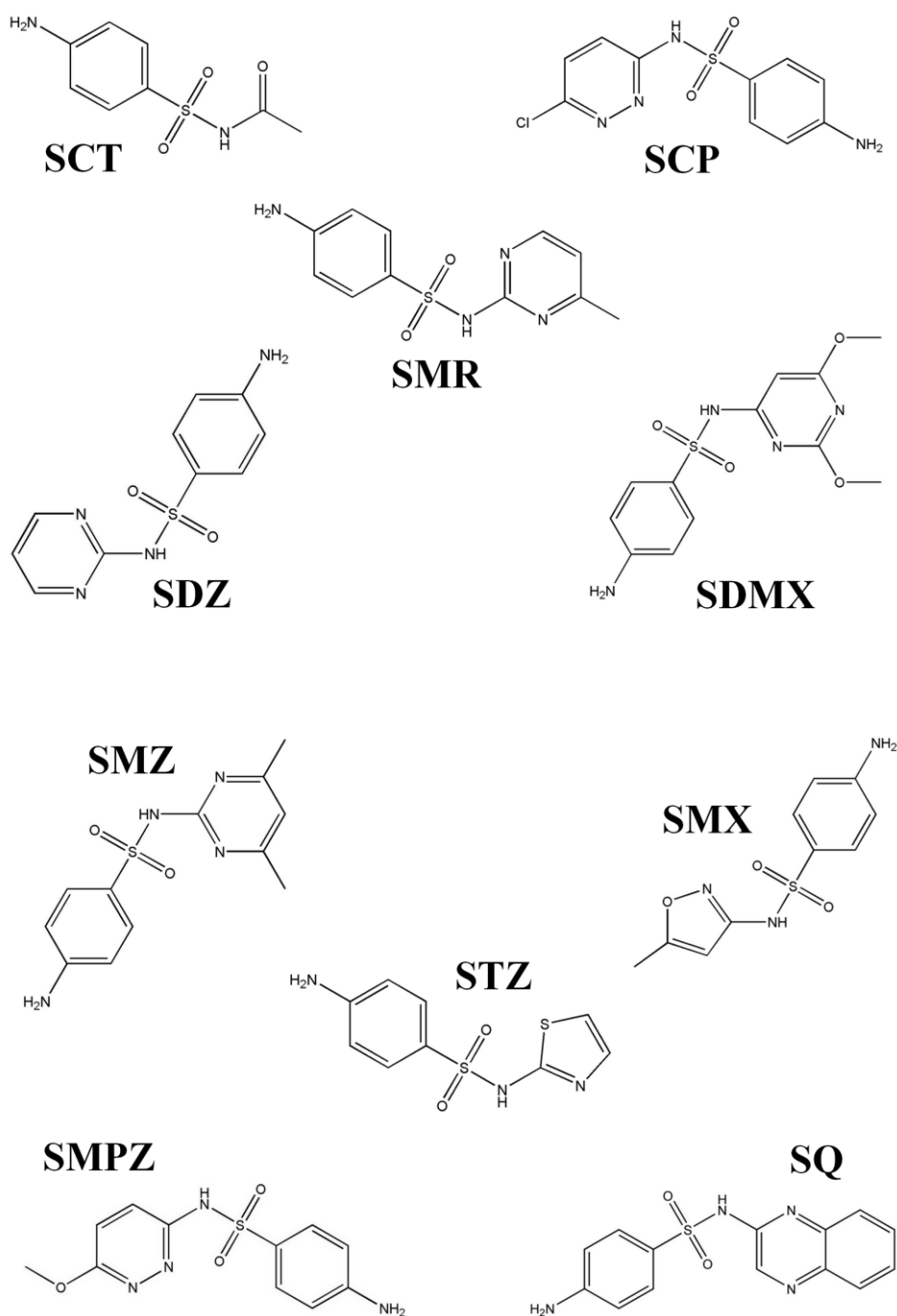


FIGURA 3 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS SULFONAMIDAS

Nota: SCT: sulfacetamida, SCP: sulfaclopiridazina, SMR: sulfamerazina, SDZ: sulfadiazina, SDMX: sulfadimetoxina, SMZ: sulfametazina, SMX: sulfametoxazol, STZ: sulfatiazol, SMPZ: sulfametoxipiridazina e SQ: sulfaquinoxalina.

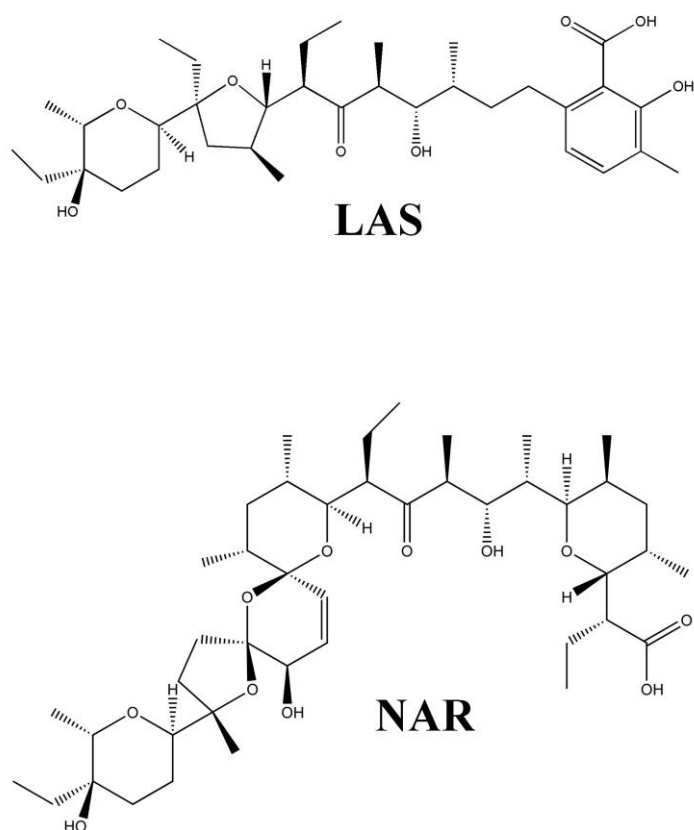


FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS COCCIDIOSTÁTICOS  
Nota: LAS: lasalocid e NAR: narasina

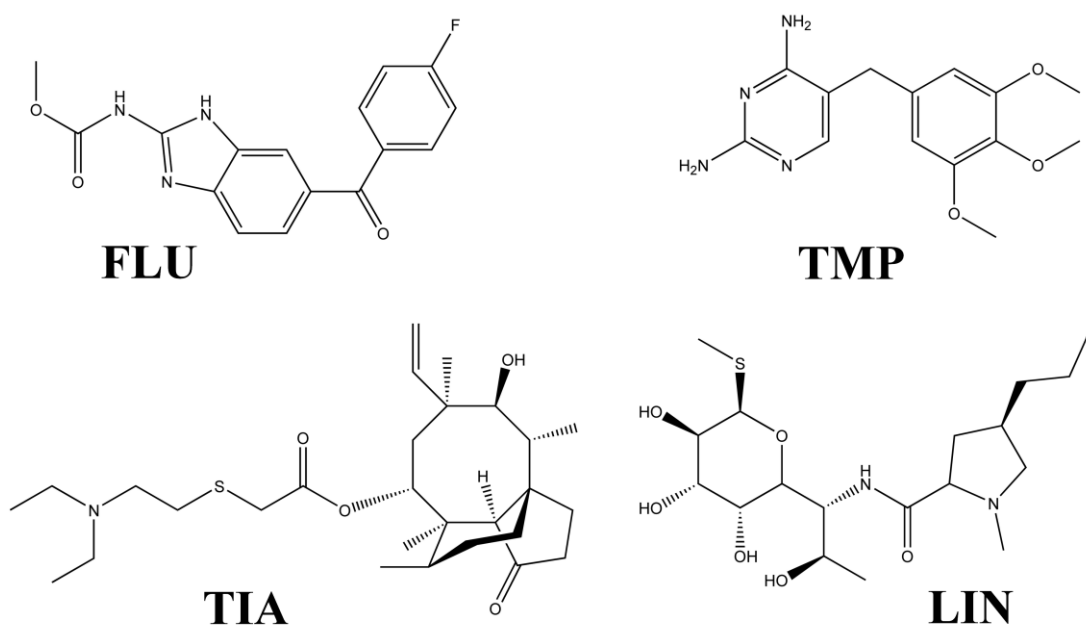


FIGURA 5 – ESTRUTURA QUÍMICA DO FLUBENDAZOL (FLU), TRIMETOPRIM (TMP), TIAMULINA (TIA) E LINCOMICINA (LIN)

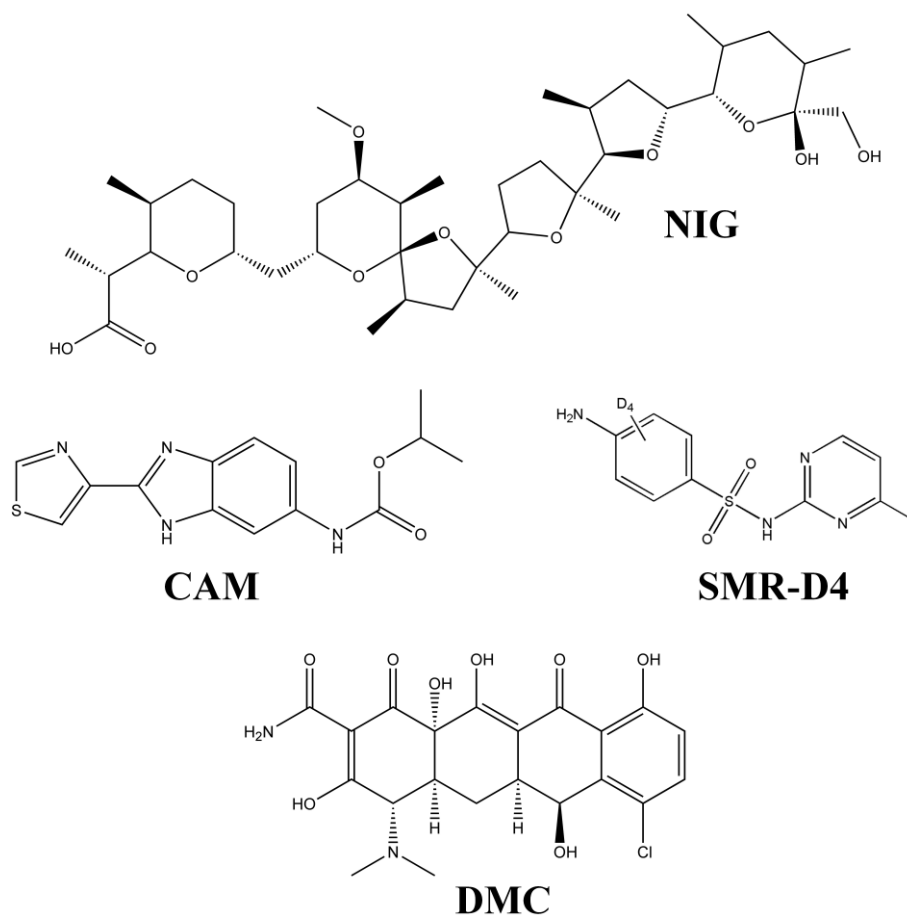


FIGURA 6 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS PADRÕES INTERNOS

Nota: NIG: nigericina, CAM: cambendazol, SMR-D4: sulfamerazina deuterada e DMC: demeclociclina

### 3.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções estoque foram preparadas individualmente para cada analito e em diferentes concentrações em virtude das características de solubilidade. As seguintes soluções estoque foram preparadas:

- 1 mg mL<sup>-1</sup> em metanol para tiamulina;
- 500 µg mL<sup>-1</sup> em metanol para cloridrato de demeclociclina, cloridrato de tetraciclina, clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, eritromicina, tartarato de tilosina, cloridrato de lincomicina, sulfamerazina deuterada, sulfadiazina, sulfadimetoxina, sulfamerazina, sulfametoxazol, sulfacetamida,



sulfacloropiridazina, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, trimetoprim, nigericina e narasina;

- 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila/metanol (50:50 v/v) para cambendazol e flubendazol;
- 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila para o lasalocid (disponibilizado diluído pelo fornecedor Sigma-Aldrich)

As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque através de diluição em metanol, de acordo com a necessidade de cada experimento. Todas as soluções foram armazenadas em frasco âmbar a 4 °C.

### 3.4 EQUIPAMENTOS, INSTRUMENTOS E CONSUMÍVEIS

Os equipamentos e instrumentos utilizados para o desenvolvimento do método LC-MS/MS foram:

- Balança analítica Mettler Toledo, modelo Excellence Plus XP 205, com precisão de 0,01 mg (Ohio, EUA);
- Banho de ultrassom Branson 2510 (Connecticut, EUA);
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5810-R (Hamburgo, Alemanha);
- Concentrador de amostras Centrivap, Labconco (Missouri, EUA);
- Cromatógrafo da Agilent, modelo 1200 equipado com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B, forno de coluna G1316B (Delaware, EUA) e injetor automático CTC Waters 2777 Sample Manager (Connecticut, EUA);
- Espectrômetro de massas triplo quadrupolo da Applied Biosystems, modelo API 3200 (Ontário, Canadá) equipado com bomba de infusão Havard 22 Apparatus (Massachusetts, EUA) e interface *electrospray* (ESI). Os dados foram processados utilizando o software Analyst, versão 1.4 (ABI/Sciex);
- Gerador de nitrogênio PEAK Scientific Instruments (Illinois, EUA);

- Liquidificador Durabrand, modelo L-20 (M.K. Eletrodomésticos Mondial LTDA, Bahia, Brasil);
- Manifold, Waters (Connecticut, EUA);
- Purificador de água Milli-Q- Millipore, A10 Gradiente (Connecticut, EUA);
- Vortex, Genie 2, Scientific Industries (Nova Iorque, EUA).

Os consumíveis utilizados para o desenvolvimento do método LC-MS/MS foram:

- Cartucho para extração em fase sólida 60 mg/3 mL Oasis HLB, Waters (Connecticut, EUA);
- Coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m), Waters (Connecticut, EUA);
- Eppendorf, Brand (Baden-Württemberg, Alemanha);
- Filtro de seringa Agilent HP PVDF hidrofílico 0,22  $\mu$ m de poro (Califórnia, EUA);
- Pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m), Waters (Connecticut, EUA);
- Tubo para centrifugação tipo Falcon 15 mL, Techno Plastic Products (Trasadingen, Suíça);

### 3.5 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS

#### 3.5.1 Seleção dos analitos de interesse

Foram selecionadas somente substâncias com Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido para ovo e aquelas cujo uso não é autorizado para animais produtores de ovos para consumo humano, priorizando algumas classes

farmacológicas de maior interesse para monitoramento nesse alimento. A seleção foi efetuada com base nas informações disponibilizadas nos seguintes documentos:

- RDC n. 53, de 02 de outubro de 2012, que dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL - Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (BRASIL, 2012a);
- Regulamento n. 124/2009 da Comissão Europeia, de 10 de fevereiro de 2009, que define os limites máximos para a presença de coccidiostáticos ou histomonostáticos em alimentos (CCE, 2009a);
- Regulamento n. 37/2010 da Comissão Europeia, de 22 de dezembro de 2009, que define as substâncias farmacologicamente ativas e a respectiva classificação em relação aos limites máximos de resíduos em alimentos de origem animal (CCE, 2009b);
- *Codex Alimentarius* Commission. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 35th Session (July 2012) (CODEX, 2012);
- Code of Federal Regulations Title 21. Part 556-Tolerances for residues of new animal drugs in food (FDA, 2014).

Com base nesses documentos, foram selecionados para o desenvolvimento do método LC-MS/MS as substâncias relacionadas nas Tabelas 5 e 6. Para a validação do método foram adotados os LMR preconizados pela Comissão Europeia.

## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 5 – SUBSTÂNCIAS COM LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO ESTABELECIDO PARA O OVO

Analitos	Brasil <sup>a</sup>	Comissão Europeia <sup>b</sup>	Codex Alimentarius <sup>c</sup>	FDA <sup>d</sup>
Limite Máximo de Resíduo (LMR) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )				
Clortetraciclina	200*	200	400*	400*
Eritromicina	200	150	50	25
Flubendazol		400	400	
Lasalocid		150		
Lincomicina		50		
Narasina		2		
Oxitetraciclina	200*	200	400*	400*
Tetraciclina	200*	200	400*	400*
Tiamulina		1000		
Tilosina		200	300	200

Nota: <sup>a</sup>RDC 53, de 2 de outubro de 2012, <sup>b</sup>Regulamento 37/2010, de 22 de dezembro de 2009, <sup>c</sup>Codex Alimentarius Commission, <sup>d</sup>Code of Federal Regulations-Title 21 e \*soma das tetraciclinas

TABELA 6 – SUBSTÂNCIAS CUJO USO NÃO É AUTORIZADO PARA ANIMAIS PRODUTORES DE OVOS PARA CONSUMO HUMANO

Analitos	Brasil <sup>a</sup>	Comissão Europeia <sup>b</sup>	Codex Alimentarius <sup>c</sup>	FDA <sup>d</sup>
Doxiciclina		X		
Sulfacetamida		X		
Sulfaclorpiridazina		X		
Sulfadiazina		X		
Sulfadimetoxina		X		
Sulfamerazina		X		
Sulfametazina		X		
Sulfametoxazol		X		
Sulfametoxipiridazina		X		
Sulfaquinoxalina		X		
Sulfatiazol		X		
Trimetoprim		X		

Nota: <sup>a</sup>RDC 53, de 2 de outubro de 2012, <sup>b</sup>Regulamento 37/2010, de 22 de dezembro de 2009, <sup>c</sup>Codex Alimentarius Commission e <sup>d</sup>Code of Federal Regulations-Title 21

### 3.5.2 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através de análise por infusão direta em bomba seringa, com vazão constante de  $10 \mu\text{L min}^{-1}$ . Para realização deste experimento, soluções de trabalho com diferentes concentrações dos analitos

foram preparadas separadamente com acetonitrila/água (50:50 v/v) e aditivo (ácido fórmico ou formiato de amônio). Essas soluções foram infundidas no espectrômetro de massas, sendo o sinal de cada analito avaliado conforme a concentração e o aditivo utilizado.

*Electrospray* (ESI) foi utilizado como fonte de ionização, mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5 mm na horizontal. Para otimização dos parâmetros de potencial de desagrupamento (DP), potencial de entrada (EP), potencial de entrada na cela de colisão (CEP), energia de colisão (CE) e potencial de saída da cela de colisão (CXP), a concentração dos analitos foi variada a fim de atender as especificações do equipamento para otimização automática através de *Multiple Reaction Monitoring* (intensidade de sinal entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps). Por fim, foram adquiridos os dois fragmentos mais intensos de cada analito.

As otimizações dos parâmetros da fonte de ionização, como gás de interface (CUR), gás de colisão (CAD), gás de nebulização (GS1), gás auxiliar (GS2), voltagem do capilar (IS) e temperatura da fonte, foram realizadas através de Análise por Injeção em Fluxo (FIA) acoplando o cromatógrafo sem coluna ao espectrômetro de massas. Para isso, foi utilizada como fase móvel uma mistura de acetonitrila/água (50:50 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico. A vazão foi mantida em  $200 \mu\text{L min}^{-1}$  e a posição do capilar em 3 mm na vertical e 5 mm na horizontal. O volume de injeção foi de 10  $\mu\text{L}$ .

### 3.5.3 Otimização da cromatografia

Para a otimização da cromatografia foi utilizada uma coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ) acoplada a uma pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ). Diferentes proporções de acetonitrila, água e metanol foram avaliadas para compor a fase móvel. Diferentes vazões (200 a  $400 \mu\text{L min}^{-1}$ ) foram testadas. O volume de injeção foi mantido em 10  $\mu\text{L}$  e a temperatura da coluna em 35 °C.

A seleção do sistema cromatográfico foi realizada com base no melhor perfil e separação dos picos cromatográficos, intensidade de sinal e tempo de corrida.

### 3.6 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ

Diferentes técnicas e procedimentos foram testados para avaliar qual a melhor maneira de extrair os analitos e padrões internos do ovo, incluindo a precipitação de proteínas e a extração em fase sólida.

Para condução dos ensaios, sextuplicatas de 1 g de ovo previamente homogeneizado (Seção 3.1) e isento dos analitos de interesse foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL, e em seguida fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos padrões internos, de modo a obter a concentração final de 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de cada substância.

Após a fortificação, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min, permaneceram em repouso por 5 min e a extração foi realizada através dos seguintes procedimentos:

*Precipitação de proteínas com acetonitrila* (Procedimento A): Uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min e permaneceu em repouso por 5 min. Então, 5 mL de acetonitrila foi adicionada e a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min e sonicada por 10 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada (Eppendorf 5810-R, Hamburg, Alemanha) a 4000 rpm, 4 °C, 15 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e evaporado em um concentrador de amostras a 40 °C (CentriVap Labconco, Missouri, EUA) até atingir 500  $\mu\text{L}$ . O extrato obtido foi diluído com 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min, sonicada por 10 min e centrifugada a 4000 rpm, 4 °C, 15 min. Por fim, o sobrenadante foi diluído (1:1 v/v) com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ /acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v). A amostra foi centrifugada a 14000 rpm, 4 °C, 15 min e filtrada através de filtro de seringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Agilent HP, Califórnia, EUA) antes da análise.

*Extração em fase sólida:* Uma alíquota do solvente 1 (Tabela 7) foi acrescentada. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min e permaneceu em repouso por 5 min. Então, 5 mL de acetonitrila foi adicionada e a amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min e sonicada por 10 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada (Eppendorf 5810-R, Hamburg, Alemanha) a 4000 rpm, 4 °C, 15 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e evaporado em um concentrador de amostras a 40 °C (CentriVap Labconco, Missouri, EUA) até atingir 1 mL. O extrato obtido foi diluído com o solvente 2 (Tabela 7), homogeneizado em vórtex por 1 min e centrifugado a 4000 rpm, 4 °C, 15 min. O sobrenadante foi aplicado em um cartucho de extração em fase sólida Oasis HLB (3 mL/60 mg, Waters, Connecticut, EUA), previamente condicionado com 3 mL de acetonitrila e 3 mL de água ultra pura. A amostra foi eluída pelo cartucho, e a fase estacionária lavada com 6 mL de água ultra pura. A eluição dos analitos foi realizada com o solvente 3 (Tabela 7). O eluato foi evaporado em um concentrador de amostras a 40 °C, e o resíduo seco foi redissolvido com 1 mL de acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v), mediante agitação em vórtex por 1 min. A amostra foi centrifugada a 4000 rpm, 4 °C, 15 min e filtrada através de filtro de seringa PVDF de 0,22 µm de poro (Agilent HP, Califórnia, EUA) antes da análise.

A recuperação foi estimada em porcentagem, através da comparação com uma sextuplicata de amostras fortificadas após o respectivo procedimento de extração. O melhor procedimento foi definido como aquele que apresentou a maior recuperação dos analitos com adequada repetibilidade. A descrição do preparo das soluções tampão encontra-se no Anexo 4, o fluxograma do Procedimento A no Anexo 5 e o fluxograma dos Procedimentos B ao I no Anexo 6.

## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 7 – SOLVENTES UTILIZADOS NOS DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Procedimento	Solvente 1	Solvente 2	Solvente 3
<b>B</b>	-	5 mL de água ultra pura	6 mL de acetonitrila
<b>C</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup>	5 mL de água ultra pura	6 mL de acetonitrila
<b>D</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup> 1 mL de tampão citrato pH 3	5 mL de tampão citrato pH 3	6 mL de acetonitrila
<b>E</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup> 1 mL de tampão acetato pH 4,5	5 mL de tampão acetato pH 4,5	6 mL de acetonitrila
<b>F</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup> 1 mL de tampão acetato pH 6	5 mL de tampão acetato pH 6	6 mL de acetonitrila
<b>G</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup> 1 mL de tampão fosfato pH 7	5 mL de tampão fosfato pH 7	6 mL de acetonitrila
<b>H</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup> 1 mL de tampão fosfato pH 8	5 mL de tampão fosfato pH 8	6 mL de acetonitrila
<b>I</b>	400 µL de EDTA 100 mmol L <sup>-1</sup>	5 mL de água ultra pura	3 mL de acetonitrila 3 mL de acetato de etila

Nota: as soluções tampão foram preparadas conforme a Farmacopeia Europeia, 6ª edição.

### 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS DE OVO

Uma alíquota de 50 µL de metanol e 50 µL da solução de trabalho dos padrões internos (para obter uma concentração final de 150 µg kg<sup>-1</sup> de nigericina, 200 µg kg<sup>-1</sup> de sulfamerazina deuterada, 200 µg kg<sup>-1</sup> de demeclociclina e 400 µg kg<sup>-1</sup> de cambendazol) foi adicionada aos tubos Falcon contendo 1 g das amostras de ovo. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400 µL de EDTA 100 mmol L<sup>-1</sup> foi acrescentada. A amostra foi novamente agitada em vórtex por 1 min e permaneceu em repouso por 5 min. Posteriormente, foi adicionado 5 mL de acetonitrila, procedendo a homogeneização em vórtex por 1 min e sonicação por 10 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada (4000 rpm, 4 °C, 15 min). O sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL e evaporado em um concentrador de amostras a 40 °C até atingir 500 µL. O extrato obtido foi



diluído com 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min, sonicada por 10 min e centrifugada (4000 rpm, 4 °C, 15 min). Por fim, o sobrenadante foi diluído (1:1 v/v) com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ /acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v). A amostra foi centrifugada (14000 rpm, 4 °C, 15 min) e filtrada através de filtro de seringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro antes da análise.

### 3.8 INSTRUMENTAÇÃO

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo a Líquido Agilent 1200 (Wilmington, EUA) composto de bomba binária G1312B, desgaseificador G1379B, e forno de coluna G1316B. O sistema foi conectado a um gerenciador de amostras CTC 2777 (Waters Corporation, Connecticut, EUA), que durante as análises foi mantido a 20 °C. A mistura acetonitrila/metanol (50:50 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico foi utilizada separadamente como solvente de limpeza do injetor automático.

O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo Triplo Quadrupolo API 3200 (Applied Biosystems, Ontário, Canadá), equipado com bomba de seringa Havard 22 Dual Model (Harvard Apparatus, Massachusetts, EUA) e fonte de ionização por *electrospray* (ESI). Para o monitoramento em ovos dos analitos de interesse foram ajustados os seguintes parâmetros:

- Fase móvel: água e acetonitrila/metanol (80:20 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido fórmico.
- Vazão: 400  $\mu\text{L min}^{-1}$ , modo gradiente de eluição.
- Coluna: XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) acoplada a uma pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) (Waters, Connecticut, EUA).
- Temperatura de forno da coluna: 35 °C.
- Volume de injeção: 10  $\mu\text{L}$ .
- Fonte de ionização: *electrospray*, no modo positivo.

## MATERIAL E MÉTODOS

- Parâmetros da fonte de ionização: voltagem do capilar (IS): 5000 V, temperatura da fonte: 500 °C, gás de interface (CUR): 12 psi, gás de colisão (CAD): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 45 psi e gás auxiliar (GS2): 50 psi.
- Parâmetros individuais e transições monitoradas de cada composto: de acordo com o descrito na Tabela 8.

O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR, GS1 e GS2 foi produzido por um gerador de nitrogênio da Peak Scientific Instruments (Illinois, EUA). Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados através do software Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

TABELA 8 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO (continua)

Compostos	Íon precursor (m/z)	Íon fragmento (m/z)	Dwell time (ms)	DP <sup>a</sup> (V)	EP <sup>b</sup> (V)	CEP <sup>c</sup> (V)	CE <sup>d</sup> (eV)	CXP <sup>e</sup> (V)
CTC <sup>f</sup>	478,8	444,0	150	31	9,5	22	25	32
		462,0	150	31	9,5	22	23	8
DXC <sup>f</sup>	445,0	428,1	200	26	4,5	28	21	34
		154,1	200	51	8	22	45	4
ERY <sup>f</sup>	734,1	158,2	150	36	8,5	28	43	4
		116,2	150	36	8,5	28	59	4
FLU <sup>f</sup>	314,1	282,1	200	46	9,5	26	27	6
		123,1	200	46	9,5	26	47	4
LAS <sup>g</sup>	613,2	377,3	150	91	11	24	47	8
		595,5	150	91	11	24	31	42
LIN <sup>f</sup>	407,1	126,1	150	41	9	20	37	4
		70,1	150	41	9	20	89	4
NAR <sup>g</sup>	787,3	431,4	250	111	10,5	30	59	8
		531,4	250	111	10,5	30	51	4
OTC <sup>f</sup>	460,9	426,1	200	31	4,5	20	25	34
		201,1	200	31	4,5	20	51	4
SCT <sup>f</sup>	215,0	156,1	150	21	10,5	14	13	4
		92,1	150	21	10,5	14	29	4
SCP <sup>f</sup>	284,9	156,0	150	26	9	16	19	4
		92,1	150	26	9	16	39	4
SDZ <sup>f</sup>	251,1	156,1	150	31	9,5	16	19	4
		92,0	150	31	9,5	16	37	4
SDMX <sup>f</sup>	311,0	156,1	250	41	10	16	25	4
		92,1	250	41	10	16	43	4

## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 8 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO (conclusão)

Compostos	Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon fragmento ( <i>m/z</i> )	Dwell time (ms)	DP <sup>a</sup> (V)	EP <sup>b</sup> (V)	CEP <sup>c</sup> (V)	CE <sup>d</sup> (eV)	CXP <sup>e</sup> (V)
SMR <sup>f</sup>	265,0	156,1	250	36	10	16	21	4
		108,1	250	36	10	16	33	4
SMZ <sup>f</sup>	279,0	186,2	150	46	10,5	16	21	4
		108,2	150	46	10,5	16	37	4
SMX <sup>f</sup>	253,9	156,0	150	31	9,5	16	19	4
		92,1	150	31	9,5	16	35	4
SMPZ <sup>f</sup>	281,0	156,1	150	56	12	14	21	4
		92,2	150	56	12	14	41	4
SQ <sup>f</sup>	301,0	156,0	200	31	10	16	21	4
		92,1	200	31	10	16	41	4
STZ <sup>f</sup>	255,9	156,1	250	46	11,5	16	19	4
		108,2	250	46	11,5	16	31	4
TC <sup>f</sup>	445,0	410,0	250	36	9	20	23	8
		428,1	250	45	4,5	21	20	32
TIA <sup>f</sup>	494,1	192,2	150	41	10	24	27	4
		119,1	150	41	10	24	51	4
TMP <sup>f</sup>	291,0	230,1	150	56	10	18	27	4
		123,1	150	56	10	18	31	4
TYL <sup>f</sup>	916,1	174,2	200	71	11,5	32	51	4
		101,3	200	71	11,5	32	67	4
CAM <sup>*f</sup>	303,0	217,1	150	41	9	22	39	4
		261,1	150	41	9	22	21	4
DMC <sup>*f</sup>	464,8	448,0	150	31	8,5	22	23	8
		430,0	150	31	8,5	22	27	8
NIG <sup>*g</sup>	747,3	703,5	150	126	12	32	45	58
		501,2	150	101	9	34	59	44
SMR-D4 <sup>*f</sup>	269,0	96,1	150	51	10,5	16	39	4
		160,0	150	51	10,5	16	23	4

Nota: <sup>a</sup>DP: potencial de desagrupamento; <sup>b</sup>EP: potencial de entrada; <sup>c</sup>CEP: potencial de entrada na cela de colisão; <sup>d</sup>CE: energia de colisão; <sup>e</sup>CXP: potencial de saída da cela de colisão; <sup>f</sup>[M+H]<sup>+</sup>; <sup>g</sup>[M+Na]<sup>+</sup>; DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TC: tetraciclina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; CAM: cambendazol; DMC: demeclociclina; SMR-D4: sulfamerazina deuterada; NIG: nigericina; \*: padrão interno.

### 3.9 VALIDAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS

O método por LC-MS/MS foi validado de acordo com os critérios estabelecidos pela Diretiva 2002/657/EC da Comissão das Comunidades Europeias e pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos - RDC nº 27, de 17 de maio de 2012 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (CCE, 2002; BRASIL, 2012b). De acordo com esses guias os ensaios a serem realizados para validar o método incluem: seletividade, sensibilidade (limite de detecção, limite de quantificação, limite de decisão e capacidade de detecção), linearidade, efeito residual, efeito matriz, recuperação, precisão, exatidão, robustez e estabilidade.

#### 3.9.1 Seletividade

Para realização desse ensaio, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de metanol foram adicionadas a 20 tubos Falcon de 15 mL, cada um contendo 1 g de ovo homogeneizado (obtidos de duas fontes distintas – A e B). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. Os analitos foram extraídos conforme descrito na Seção 3.7.

Os cromatogramas obtidos não devem apresentar nenhum pico interferente no mesmo tempo de retenção dos analitos e padrões internos, indicando que o método é seletivo.

#### 3.9.2 Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $\text{CC}\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $\text{CC}\beta$ )

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram estimados pela relação sinal/ruído. Para conduzir esse estudo, alíquotas de 1 g de ovo foram

acrescidas de 100  $\mu\text{L}$  de metanol. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. A extração foi realizada conforme descrito na Seção 3.7. O extrato obtido foi diluído com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos, 50  $\mu\text{L}$  de metanol e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, de modo obter uma concentração final de 250  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de cada analito. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min, sonicada por 10 min e centrifugada (4000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 min). Por fim, o sobrenadante foi diluído em série com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ /acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v) e analisado por LC-MS/MS até que o menor pico detectável de cada analito fosse obtido. Para cada analito o LD foi calculado automaticamente como o menor pico de concentração com um sinal/ruído de pelo menos 3:1 e o LQ foi calculado automaticamente como o menor pico de concentração com um sinal/ruído de no mínimo 10:1.

O limite de decisão ( $\text{CC}_{\alpha}$ ) foi calculado usando dois procedimentos diferentes, um para substâncias proibidas e outro para substâncias permitidas com Limite Máximo de Resíduo (LMR):

- Para as substâncias proibidas, doxiciclina (DXC), sulfadiazina (SDZ), sulfadimetoxina (SDMX), sulfamerazina (SMR), sulfametazina (SMZ), sulfametoxazol (SMX), sulfametoxipiridazina (SMPZ), sulfacetamida (SCT), sulfaclorpiridazina (SCP), sulfaquinoxalina (SQ), sulfatiazol (STZ) e trimetoprim (TMP), o LD foi utilizado como  $\text{CC}_{\alpha}$ .
- Para as substâncias permitidas com LMR, clortetraciclina (CTC), eritromicina (ERY), flubendazol (FLU), lasalocid (LAS), lincomicina (LIN), narasina (NAR), oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), tiamulina (TIA) e tilosina (TYL), o  $\text{CC}_{\alpha}$  foi determinado através da análise de 20 amostras de ovos fortificados com os analitos ao nível de LMR (Tabela 9). O  $\text{CC}_{\alpha}$  foi calculado como o LMR mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente.

## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 9 – VALORES DO LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR) PARA SUBSTÂNCIAS PERMITIDAS

Substâncias permitidas	LMR ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Eritromicina e lasalocid	150
Flubendazol	400
Lincomicina	50
Narasina	2
Oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina e tilosina	200
Tiamulina	1000

Fonte: (CCE, 2009)

Para ambos os grupos de substâncias, a capacidade de decisão ( $CC\beta$ ) foi determinada através da análise de 20 amostras de ovos fortificados com os analitos na concentração do  $CC\alpha$ . A  $CC\beta$  foi calculada como o  $CC\alpha$  mais 1,64 vezes o desvio padrão correspondente.

### 3.9.3 Linearidade

A linearidade do método foi demonstrada utilizando o método da padronização interna. Alíquotas de 1 g de ovo homogeneizado foram transferidas para tubos Falcon de 15 mL e fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos, de modo a obter sete níveis de concentração. Conforme exigido pela Diretiva 2002/657/EC o nível zero, sem fortificação dos analitos, também foi incluso (Tabela 10). As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. Os analitos foram extraídos conforme descrito na Seção 3.7.

Para cada composto, a curva de calibração foi usada para confirmar a relação linear entre a área do pico do analito/área do pico do padrão interno *versus* a concentração do analito/concentração do padrão interno. As curvas de calibração foram construídas através do método dos quadrados mínimos utilizando regressão linear 1/x. O ângulo, o intercepto e o coeficiente de correlação ( $r$ ) foram calculados como parâmetros da regressão. Como critério de aceitação, o coeficiente de regressão deve ser igual ou superior a 0,99 e nenhum desvio maior que 15% nos valores de precisão e exatidão devem ser observados em cada nível de concentração (BRASIL, 2012b). Além disso, para cada analito foi realizada a análise

## MATERIAL E MÉTODOS

de variância (nível de 95%), a fim de avaliar o ajuste do modelo linear e a validade da regressão. Os níveis de concentração de cada analito estão descritos na Tabela 10.

O padrão interno cambendazol foi utilizado para a eritromicina, flubendazol, lincomicina, tiamulina e tilosina. O padrão interno demeclociclina foi utilizado para as tetraciclinas. Já o padrão interno sulfamerazina deuterada foi utilizado para as sulfonamidas e trimetoprim. Por fim, a nigericina foi utilizada como padrão interno para o lasalocid e a narasina.

TABELA 10 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS DOS ANALITOS EM ESTUDO

Substâncias proibidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	0 MNV	1 MNV	1,5 MNV	2 MNV	2,5 MNV	3 MNV	3,5 MNV	4 MNV
DXC / SCT / SCP / SDZ / SDMX / SMR / SMZ / SMX / SMPZ / SQ / STZ / TMP	0	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
Substâncias permitidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	0 LMR	0,5 LMR	0,75 LMR	1 LMR	1,25 LMR	1,5 LMR	1,75 LMR	2 LMR
ERY / LAS	0	75	112,5	150	187,5	225	262,5	300
FLU	0	200	300	400	500	600	700	800
LIN	0	25	37,5	50	62,5	75	87,5	100
NAR	0	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
OTC / CTC / TC / TYL	0	100	150	200	250	300	350	400
TIA	0	500	750	1000	1250	1500	1750	2000
CAM*	400	400	400	400	400	400	400	400
DMC* / SMR-D4*	200	200	200	200	200	200	200	200
NIG*	150	150	150	150	150	150	150	150

Dados: MNV: menor nível de validação; LMR: limite máximo de resíduo; DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TC: tetraciclina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; CAM: cambendazol; DMC: demeclociclina; SMR-D4: sulfamerazina deuterada; NIG: nigericina; \*: padrão interno.

### 3.9.4 Efeito matriz

O efeito matriz foi avaliado em dois níveis de concentração (1 e 4 MNV para substâncias proibidas e 0,5 e 2 LMR para as substâncias permitidas), conforme descrito na Tabela 11.

Para conduzir o estudo, doze amostras de ovo procedentes da fonte A e doze amostras procedentes da fonte B foram acrescidas de 100  $\mu\text{L}$  de metanol. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. A extração foi realizada conforme descrito na Seção 3.7. O extrato obtido foi diluído com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos, 50  $\mu\text{L}$  da solução de padrões internos e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min, sonicada por 10 min e centrifugada (4000 rpm, 4 °C, 15 min). Por fim, o sobrenadante foi diluído (1:1 v/v) com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ / acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v). A amostra foi centrifugada (14000 rpm, 4 °C, 15 min) e filtrada através de filtro de seringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Para preparar as amostras em solução, doze alíquotas de 900  $\mu\text{L}$  de água ultrapura foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução de padrões internos. Em seguida, as soluções foram homogeneizadas em vórtex por 1 min e diluídas (1:1 v/v) com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ / acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v).

Para cada nível de concentração foi calculado o fator matriz normalizado - FMN (resposta do analito na matriz/resposta do padrão interno na matriz *versus* a resposta do analito na solução/resposta do padrão interno na solução) das respostas obtidas com os analitos em amostra de ovo e em solução, ambos preparados nos mesmos níveis de concentração. O desvio padrão relativo (DPR) de todas as amostras deve ser inferior a 15%, indicando que o efeito matriz não é significativo (BRASIL, 2012b).



## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 11 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ

Substâncias proibidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
	1 MNV	4 MNV
DXC / SCT / SCP / SDZ / SDMX / SMR SMZ SMX / SMPZ / SQ / STZ / TMP	25	100
Substâncias permitidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	
	0,5 LMR	2 LMR
ERY / LAS	75	300
FLU	200	800
LIN	25	100
NAR	1	4
OTC / CTC / TC / TYL	100	400
TIA	500	2000
CAM*	400	400
DMC* / SMR-D4*	200	200
NIG*	150	150

Dados: MNV: menor nível de validação; LMR: limite máximo de resíduo; DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TC: tetraciclina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; CAM: cambendazol; DMC: demeclociclina; SMR-D4: sulfamerazina deuterada; NIG: nigericina; \*: padrão interno.

### 3.9.5 Efeito residual

O efeito residual foi avaliado através de uma injeção alternada entre uma amostra de ovo fortificada no nível mais alto de concentração (4 MNV e 2 LMR) e uma amostra isenta dos analitos, em triplicata. A resposta do pico interferente no tempo de retenção do analito não deve ser superior a 20% da resposta do analito no menor nível de concentração. Para o padrão interno (PI) a resposta não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2012b).

### 3.9.6 Recuperação (Eficência da extração)

Para realizar o ensaio de recuperação, dois conjuntos de amostras foram preparados: o fortificado antes da extração (Conjunto A) e o fortificado depois da extração (Conjunto B). Cada conjunto foi preparado em três níveis de concentração

(1, 2 e 3 MNV para substâncias proibidas e 0,5, 1 e 1,5 LMR para as substâncias permitidas).

Para o preparo do Conjunto A, 18 amostras de ovo (isenta dos analitos de interesse) foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos, sendo uma sextuplicata para cada nível de concentração. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. Os analitos foram extraídos conforme descrito na Seção 3.7.

Para o preparo do Conjunto B, 18 amostras de ovo (isenta dos analitos de interesse) receberam 100  $\mu\text{L}$  de metanol. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. A extração foi realizada conforme descrito na Seção 3.7. O extraído obtido foi diluído com 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos, 50  $\mu\text{L}$  da solução de padrões internos e 400  $\mu\text{L}$  de água ultra pura, sendo uma sextuplicata para cada nível de concentração. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min, sonicadas por 10 min e centrifugadas (4000 rpm, 4 °C, 15 min). Por fim, os sobrenadantes foram diluídos (1:1 v/v) com acetato de sódio 5 mmol  $\text{L}^{-1}$ /acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v) e as amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 4 °C, 15 min) e filtradas através de filtro de seringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro antes da análise.

A recuperação foi estimada em porcentagem, através da razão entre a média de área do analito encontrada nas amostras de ovo do Conjunto A e a média de área do analito encontrada nas amostras de ovo do Conjunto B.

### 3.9.7 Precisão e exatidão

A precisão e exatidão do método foram avaliadas através dos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial. Para realizar esses ensaios, amostras de ovo foram fortificadas com os analitos em três níveis de concentração

## MATERIAL E MÉTODOS

(1, 2 e 3 MNV para substâncias proibidas e 0,5, 1 e 1,5 LMR para as permitidas), conforme descrito na Tabela 12.

TABELA 12 – NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO UTILIZADOS PARA O ENSAIO DE PRECISÃO E EXATIDÃO

Substâncias proibidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
	1 MNV	2 MNV	3 MNV
DXC / SCT / SCP / SDZ / SDMX / SMR SMZ / SMX / SMPZ / SQ / STZ / TMP	25	50	75
Substâncias permitidas	Níveis de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )		
	0,5 LMR	1 LMR	1,5 LMR
ERY / LAS	75	150	225
FLU	200	400	600
LIN	25	50	75
NAR	1	2	3
OTC / CTC / TC / TYL	100	200	300
TIA	500	1000	1500
CAM*	400	400	400
DMC* / SMR-D4*	200	200	200
NIG*	150	150	150

Dados: MNV: menor nível de validação; LMR: limite máximo de resíduo; DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TC: tetraciclina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; CAM: cambendazol; DMC: demeclociclina; SMR-D4: sulfamerazina deuterada; NIG: nigericina; \*: padrão interno.

A repetibilidade foi determinada em sextuplicata para cada nível por três dias consecutivos e pelo mesmo analista. A reprodutibilidade intralaboratorial foi avaliada em sextuplicata para cada nível, por um segundo analista e por três dias consecutivos (CCE, 2002).

A precisão foi expressa como coeficiente de variação (CV%) entre as concentrações obtidas de cada analito, em um mesmo nível de concentração. Segundo o estabelecido pela Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), as variações não devem exceder metade dos valores referidos na Tabela 13.

## MATERIAL E MÉTODOS

TABELA 13 – VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV%
Até 100	23,0
150	21,0
200	20,0
225	20,0
300	19,0
400	18,0
500	17,7
600	17,3
1000	16,0
1500	15,0

Nota: CV% calculado pela Equação de Horwitz, seção 2.6.10.2

A exatidão foi estimada em cada nível de concentração através do cálculo de erro relativo (ER%, bias) e da recuperação, ambos obtidos pela relação entre a concentração experimental e a concentração teórica de cada analito. Segundo o estabelecido pela Diretiva 2002/657/EC (CCE, 2002), as variações devem se inserir nos intervalos referidos na Tabela 14.

TABELA 14 – VALORES ACEITÁVEIS PARA A EXATIDÃO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO

Faixa de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Intervalo aceitável (ER%, bias)
$\leq 1$	-50 a +20
> 1 a 10	-30 a +10
> 10	-20 a +10

Fonte: Diretiva 2002/657/EC

### 3.9.8 Controle de diluição – precisão e exatidão

A Diretiva 2002/657/EC não exige e nem descreve um protocolo para o controle de diluição. No entanto, esse ensaio foi realizado com o propósito de verificar se o método é capaz de determinar com precisão e exatidão uma amostra diluída. As amostras foram preparadas e analisadas em dois dias consecutivos e por analistas diferentes.

Para realização desse ensaio, seis alíquotas de 1 g de ovo foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução dos analitos e 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos, de modo a obter as concentrações de 200  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para as substâncias proibidas e

lincomicina, 8  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para narasina, 600  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para eritromicina, lasalocid e padrão interno nigericina, 800  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, tilosina, padrão interno demeclociclina e padrão interno sulfamerazina deuterada, 1600  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para flubendazol e padrão interno cambendazol e 4000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para tiamulina. Essas amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100  $\text{mmol L}^{-1}$  foi acrescentada. A extração foi realizada conforme descrito na Seção 3.7. O extrato obtido foi diluído com 100  $\mu\text{L}$  de metanol e 400  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. A amostra foi homogeneizada em vórtex por 1 min, sonicada por 10 min e centrifugada (4000 rpm, 4 °C, 15 min). O sobrenadante foi diluído (1:1 v/v) com acetato de sódio 5  $\text{mmol L}^{-1}$ / acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v). A amostra foi centrifugada (14000 rpm, 4 °C, 15 min) e filtrada através de filtro de seringa PVDF de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro. Por fim, o filtrado foi diluído (1:3 v/v) com acetato de sódio 5  $\text{mmol L}^{-1}$ / acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v) e analisado.

As variações em termos de precisão (CV%) e de exatidão (ER%, bias) não devem exceder o preconizado na Seção 3.9.7.

### 3.9.9 Robustez

A robustez do método foi avaliada considerando os fatores do método de extração que podem afetar a resposta dos analitos e padrões internos quando modificados. Os fatores selecionados para o estudo foram volume de acetonitrila, tempo de sonicação e temperatura de centrifugação. O planejamento encontra-se representado na Tabela 15.

TABELA 15 – VARIAÇÃO DOS FATORES ESTUDADOS NO PLANEJAMENTO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ

Fatores	Nominal	Variação 1	Variação 2
Volume de acetonitrila (mL)	5	4	6
Tempo de sonicação (min)	10	8	12
Temperatura de centrifugação (°C)	4	2	6

## MATERIAL E MÉTODOS

Para conduzir esse estudo, 42 alíquotas de 1 g de ovo homogeneizado foram fortificadas com 50  $\mu\text{L}$  da solução dos padrões internos e 50  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho dos analitos para obter o nível de concentração de 2 MNV para substâncias proibidas e 1 LMR para substâncias permitidas. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e em seguida uma alíquota de 400  $\mu\text{L}$  de EDTA 100 mmol  $\text{L}^{-1}$  foi acrescentada. Os analitos foram extraídos conforme descrito na Seção 3.7, considerando cada fator modificado para uma sextuplicata de amostras.

A robustez foi expressa como coeficiente de variação (CV%) comparando a média das áreas obtidas com as amostras em condição “nominal” com aquelas obtidas com as amostras em condições modificadas. A alteração no fator não é relevante quando as variações não excedem metade dos valores referidos na Tabela 16.

TABELA 16 – VALORES DE COEFICIENTE DE VARIAÇÃO (CV%) EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA O ENSAIO DE ROBUSTEZ

Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	CV%
Até 100	23,0
150	21,0
200	20,0
400	18,0
1000	16,0

Nota: CV% calculado pela Equação de Horwitz, seção 2.6.10.2

### 3.9.10 Estabilidade

#### 3.9.10.1 Estabilidade dos analitos em solução

A estabilidade dos analitos e padrões internos em solução foi avaliada mediante armazenamento ao abrigo da luz em *freezer* a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ , em refrigerador a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  e em temperatura ambiente a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Além disso, as soluções também foram avaliadas mediante armazenamento sob exposição à luz em temperatura ambiente a  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para conduzir esse estudo, foram preparados 50 mL de uma solução contendo 50 ng mL<sup>-1</sup> para as substâncias proibidas e lincomicina, 2 ng mL<sup>-1</sup> para narasina, 150 ng mL<sup>-1</sup> para eritromicina, lasalocid e padrão interno nigericina, 200 ng mL<sup>-1</sup> para clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, tilosina, padrão interno demeclociclina e padrão interno sulfamerazina deuterada, 400 ng mL<sup>-1</sup> para flubendazol e padrão interno cambendazol e 1000 ng mL<sup>-1</sup> para tiamulina. Como diluente foi utilizado a mistura 50:50 v/v de água e acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v).

A solução foi fracionada em 40 alíquotas, sendo 10 para cada temperatura de armazenamento. As alíquotas foram avaliadas logo após o preparo e após o período de uma, duas e três semanas de armazenamento.

A estabilidade foi avaliada comparando as áreas dos picos obtidas com as soluções recém-preparadas com aquelas obtidas após cada período de armazenamento. Os resultados foram expressos como a porcentagem de analito remanescente (CCE, 2002). Considera-se o analito estável em solução quando a quantidade remanescente é igual ou superior a 80% (CROUBELS; DE BAERE; DE BACKER, 2003).

### 3.9.10.2 Estabilidade dos analitos em matriz

A estabilidade dos analitos em matriz foi avaliada mediante armazenamento em *freezer* a -40 °C.

Para conduzir o estudo, 24 alíquotas de 1 g de ovo homogeneizado foram fortificadas com 50 µL da solução de trabalho dos analitos para obter o nível de concentração de 2 MNV para substâncias proibidas e 1 LMR para substâncias permitidas. Seis alíquotas receberam 50 µL da solução dos padrões internos e foram extraídas como descrito na Seção 3.7, sendo analisadas imediatamente. As demais alíquotas foram armazenadas em *freezer* a -40 °C e analisadas após o período de uma, duas, três e quatro semanas.

A estabilidade em matriz foi avaliada comparando a média de recuperação dos analitos obtida com as amostras recém-preparadas com aquela obtida após

cada período de armazenamento. Os resultados foram expressos como a porcentagem de analito remanescente (CCE, 2002). Considera-se o analito estável em matriz quando a quantidade remanescente se encontra dentro do intervalo de 80 a 110% ou conforme a veracidade mínima de -20 a +10% (CCE, 2002; CROUBELS; DE BAERE; DE BACKER, 2003).

### 3.9.10.3 Estabilidade dos analitos na amostra pós-processamento

A estabilidade dos analitos na amostra pós-processamento foi avaliada após um período de 24 e 48 horas de armazenamento no gerenciador de amostras a 20 °C.

Para conduzir esse estudo, uma amostra (sextuplicata) obtida de acordo com o descrito na Seção 3.8.10.2 foi analisada a fresco e após os respectivos períodos de armazenamento.

A estabilidade da amostra pós-processamento foi avaliada comparando a média de recuperação dos analitos obtida com as amostras recém-preparadas com aquela obtida após 24 e 48 horas de armazenamento. Os resultados foram expressos como a porcentagem de analito remanescente (CCE, 2002). Considera-se o analito estável em amostra pós-processamento quando a quantidade remanescente se encontra dentro do intervalo de 80 a 110% ou conforme a veracidade mínima de -20 a +10% (CCE, 2002; CROUBELS; DE BAERE; DE BACKER, 2003).

### 3.10 ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE OVO

As amostras de ovos foram obtidas nos supermercados dos municípios de Curitiba-PR, Guaratuba-PR e São José dos Pinhais-PR, selecionando apenas ovos produzidos em granjas do Estado do Paraná. Foram contemplados ovos de granja, ovos caipiras e ovos orgânicos.



## MATERIAL E MÉTODOS

Os ovos de granja são aqueles obidos através de um sistema de produção intensivo, no qual as aves ficam confinadas em gaiolas, se alimentam de ração, recebem luz artificial e tem os bicos cortados para aumentar a produtividade. Os ovos caipiras são produzidos por galinhas criadas em sistemas extensivos, com alimentação variada, de origem vegetal, sendo proibido o uso de medicamentos. Por sua vez, os ovos orgânicos são produzidos por aves que recebem uma alimentação orgânica; não é permitido o corte dos bicos, nem o confinamento em gaiolas. Também é vedado o uso de medicamentos e, para receber o título de “orgânico”, o produtor precisa receber um certificado do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1999; BRASIL, 2007; ARCA, 2015).

As amostras *in natura* foram armazenadas em refrigerador a 4 °C por no máximo 15 dias. Cada amostra foi preparada conforme descrito na Seção 3.7, em sextuplicata, e analisada pelo método LC-MS/MS. A relação das amostras com as respectivas características está descrita na Tabela 17.

TABELA 17 – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS DE OVOS ANALISADAS PELO MÉTODO LC-MS/MS E SUAS CARACTERÍSTICAS DE COR, TIPO E FABRICAÇÃO

Código da amostra	Cor da casca do ovo	Tipo	Fabricação
1	Vermelho	Granja	15/01/2015
2	Vermelho	Granja	18/01/2015
3	Vermelho	Granja	19/01/2015
4	Vermelho	Caipira	14/01/2015
5	Branco	Granja	Não consta
6	Branco	Granja	16/01/2015
7	Branco	Granja	19/01/2015
8	Branco	Granja	14/01/2015
9	Branco	Granja	07/01/2015
10	Branco	Granja	06/01/2015
11	Vermelho	Granja	14/01/2015
12	Branco	Granja	14/01/2015
13	Vermelho	Caipira	30/01/2015
14	Vermelho	Orgânico	06/01/2015
15	Vermelho	Orgânico	05/01/2015

---

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

### 4.1 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS

#### 4.1.1 Otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas

##### 4.1.1.1 Otimização do sinal dos analitos

Para o desenvolvimento do método LC-MS/MS a fonte de ionização *electrospray* (ESI) foi selecionada, tendo em vista a sua robustez e detectabilidade. Soluções de trabalho foram preparadas em acetonitrila/água (50:50 v/v) com diferentes proporções de aditivos (ácido fórmico e formiato de amônio) e infundidas separadamente no espectrômetro de massas. Foram avaliados o modo de ionização, a intensidade e a estabilidade do sinal através do modo *Multiple Ions* (MI).

Para a maioria dos analitos foram observadas moléculas ionizadas na forma protonada  $[M+H]^+$  (Figura 7, espectro das sulfonamidas e tetraciclina). Entretanto, para o lasalocid, a narasina e a nigericina (padrão interno) as formas de aduto de amônio  $[M+NH_4]^+$  e aduto de sódio  $[M+Na]^+$  foram as que se apresentaram em maior abundância (Figura 8). Os íons  $[M+NH_4]^+$  são formados em virtude da presença do formiato de amônio. Já os íons  $[M+Na]^+$  são formados devido a presença de sódio no solvente (GRIMALT *et al.*, 2005).

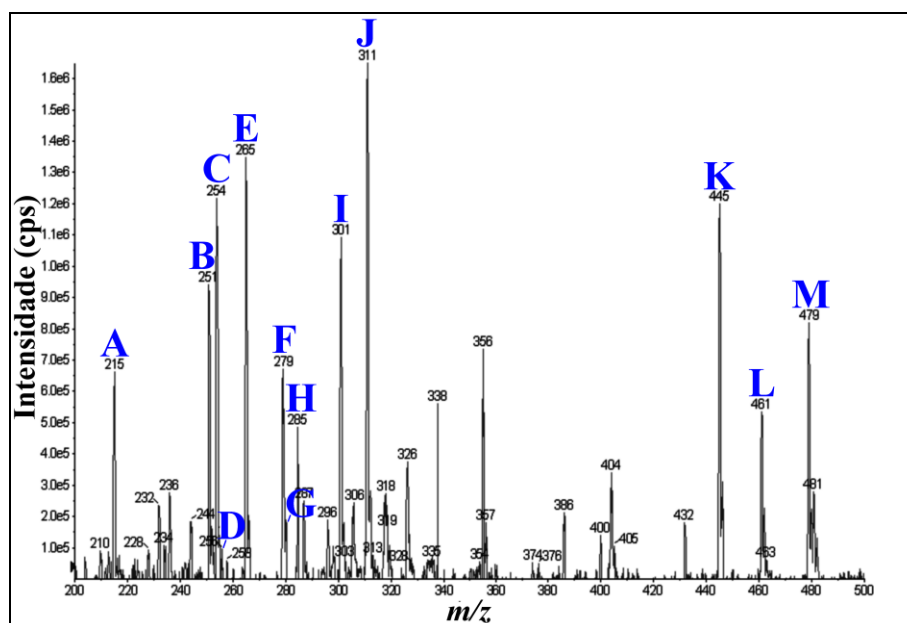


FIGURA 7 – ESPECTRO DE VARREDURA (200 A 500  $M/Z$ ) DAS SULFONAMIDAS E TETRACICLINAS OBTIDO POR INFUSÃO DIRETA DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO 250 ng mL<sup>-1</sup> DE CADA ANALITO EM ACETONITRILA/ÁGUA (50:50 V/V) COM ÁCIDO FÓRMICO A 0,1%

Nota: A - Sulfacetamida [M+H]<sup>+</sup>: 215; B - Sulfadiazina [M+H]<sup>+</sup>: 251; C - Sulfametoxazol [M+H]<sup>+</sup>: 254; D - Sulfatiazol [M+H]<sup>+</sup>: 256; E - Sulfamerazina [M+H]<sup>+</sup>: 265; F - Sulfametazina [M+H]<sup>+</sup>: 279; G - Sulfametoxipiridazina [M+H]<sup>+</sup>: 281; H - Sulfaclorpiridazina [M+H]<sup>+</sup>: 285; I - Sulfaquinoxalina [M+H]<sup>+</sup>: 301; J - Sulfadimetoxina [M+H]<sup>+</sup>: 311; K - Tetraciclina [M+H]<sup>+</sup>: 445; L - Oxitetraciclina [M+H]<sup>+</sup>: 461 e M - Clortetraciclina [M+H]<sup>+</sup>: 479.

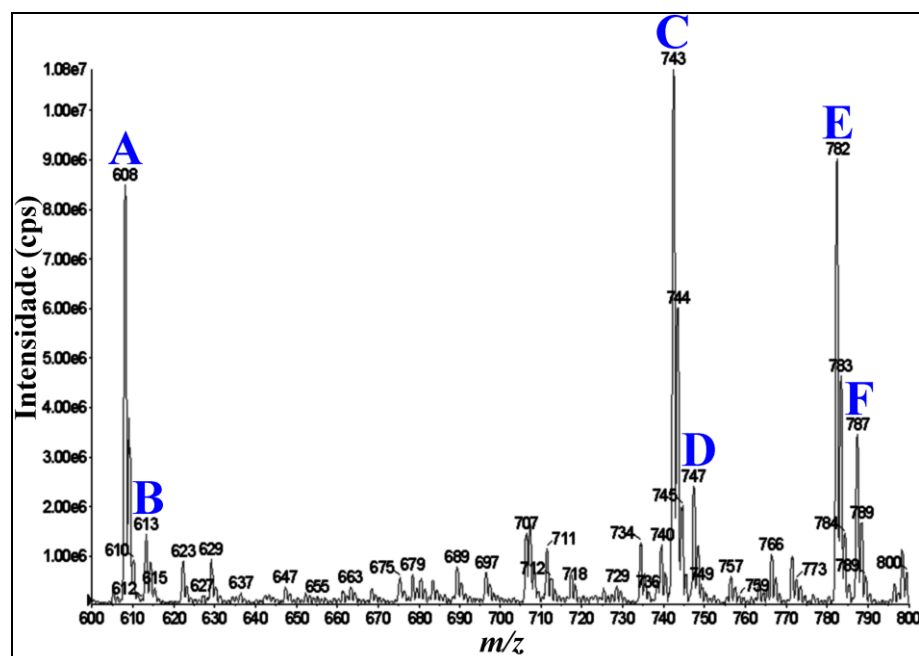


FIGURA 8 – ESPECTRO DE VARREDURA (600 A 800  $M/Z$ ) DOS COCCIDIOSTÁTICOS OBTIDO POR INFUSÃO DIRETA DE UMA SOLUÇÃO CONTENDO 1000 ng mL<sup>-1</sup> DE CADA ANALITO EM ACETONITRILA/ÁGUA (50:50 V/V) COM ÁCIDO FÓRMICO A 0,1%

Nota: A - Lasalocid [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 608; B - Lasalocid [M+Na]<sup>+</sup>: 613; C - Nigericina [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 743; D - Nigericina [M+Na]<sup>+</sup>: 747; E - Narasina [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>: 782; F - Narasina [M+Na]<sup>+</sup>: 787.

Diferentes concentrações de aditivos proporcionaram diferentes respostas de sinal para os analitos, conforme ilustrado nas Figuras 9 e 10.

Para a maioria dos analitos foi obtida uma boa intensidade de sinal quando utilizado formiato de amônio 2 mmol L<sup>-1</sup>. Entretanto, o uso desse aditivo promoveu pouca estabilidade de sinal para os íons [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> dos coccidiostáticos lasalocid, narasina e nigericina (padrão interno), o que poderia comprometer a reprodutibilidade do método. Em virtude disso, o uso do formiato de amônio foi desconsiderado.

Dentre as concentrações avaliadas de ácido fórmico, as com 0,05% e 0,1% foram as que promoveram melhores resultados. O ácido fórmico a 0,1% proporcionou uma melhor intensidade de sinal para as tetraciclina, para os íons [M+Na]<sup>+</sup> dos coccidiostáticos, para a sulfametoxipiridazina e para os padrões internos cambendazol e demeclociclina, quando comparado ao uso de ácido fórmico 0,05% (Figuras 9 e 10). Além disso, foi obtida uma boa estabilidade de sinal para os íons [M+Na]<sup>+</sup>, os quais foram selecionados para monitoramento dos coccidiostáticos. Segundo Grimalt (2005), os adutos de sódio são mais estáveis quando comparado aos de amônio, pois apresentam forte interação com os átomos de oxigênio presentes na molécula.

Diante desses resultados e de modo a priorizar os analitos que apresentaram maior dificuldade de ionização (íons [M+Na]<sup>+</sup> dos coccidiostáticos), selecionou-se o aditivo ácido fórmico a 0,1% para compor a fase móvel.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

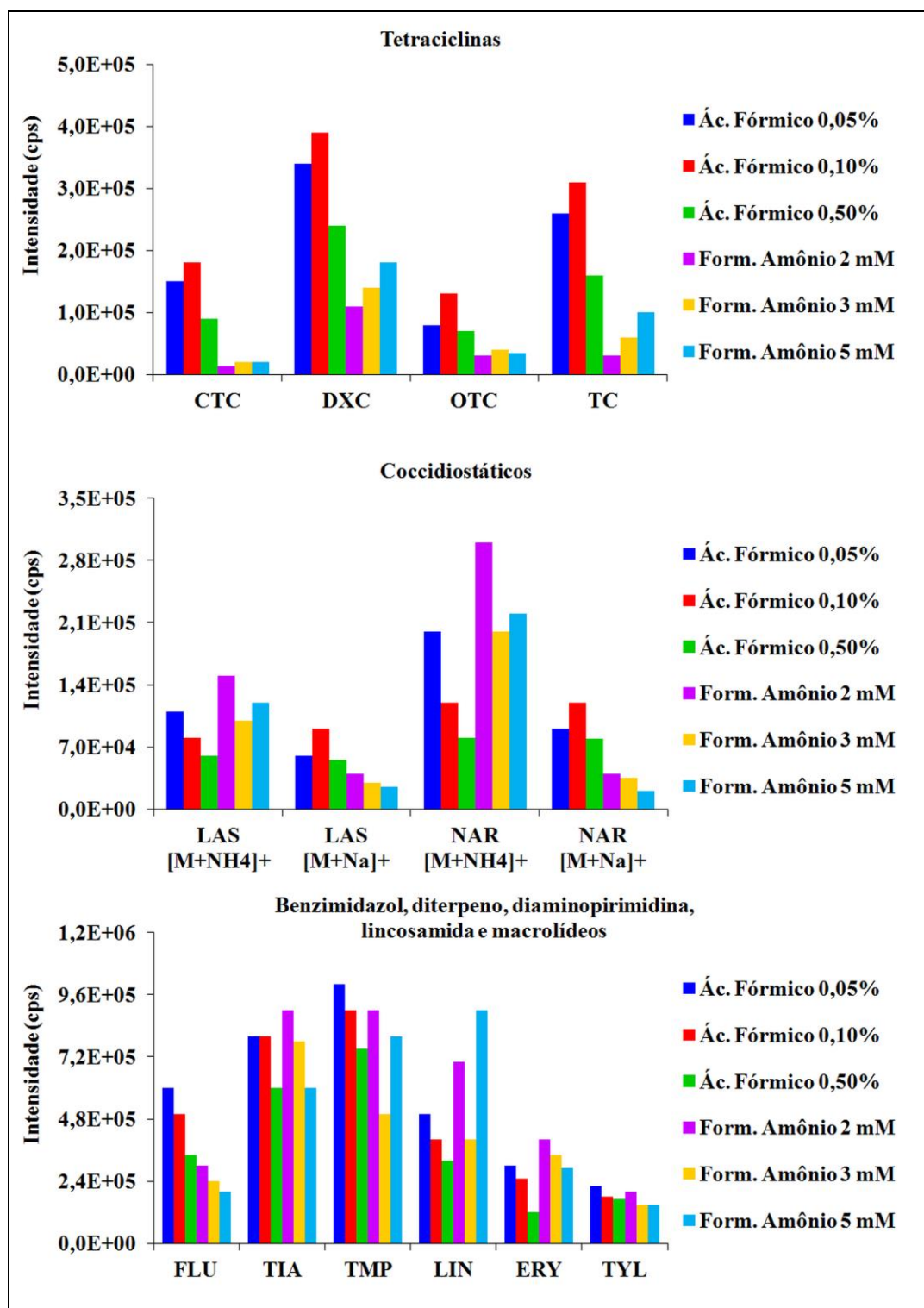


FIGURA 9 – INTENSIDADE DE SINAL DAS TETRACICLINAS, COCCIDIOSTÁTICOS, BENZIMIDAZOL, DITERPENOS, DIAMINOPYRIMIDINA, LINCOSAMIDA E MACROLÍDEOS UTILIZANDO COMO ADITIVO ÁCIDO FÓRMICO E FORMIATO DE AMÔNIO

Nota: CTC - clortetraciclina; DXC - doxiciclina; OTC - oxitetraciclina; TC - tetraciclina; LAS [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> - lasalocid aduto de amônio; LAS [M+Na]<sup>+</sup> - lasalocid aduto de sódio; NAR [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> - narasina aduto de amônio; NAR [M+Na]<sup>+</sup> - narasina aduto de sódio; FLU - flubendazol; TIA - tiamulina; TMP - trimetoprim; LIN - lincomicina; ERY - eritromicina; TYL - tilosina;

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

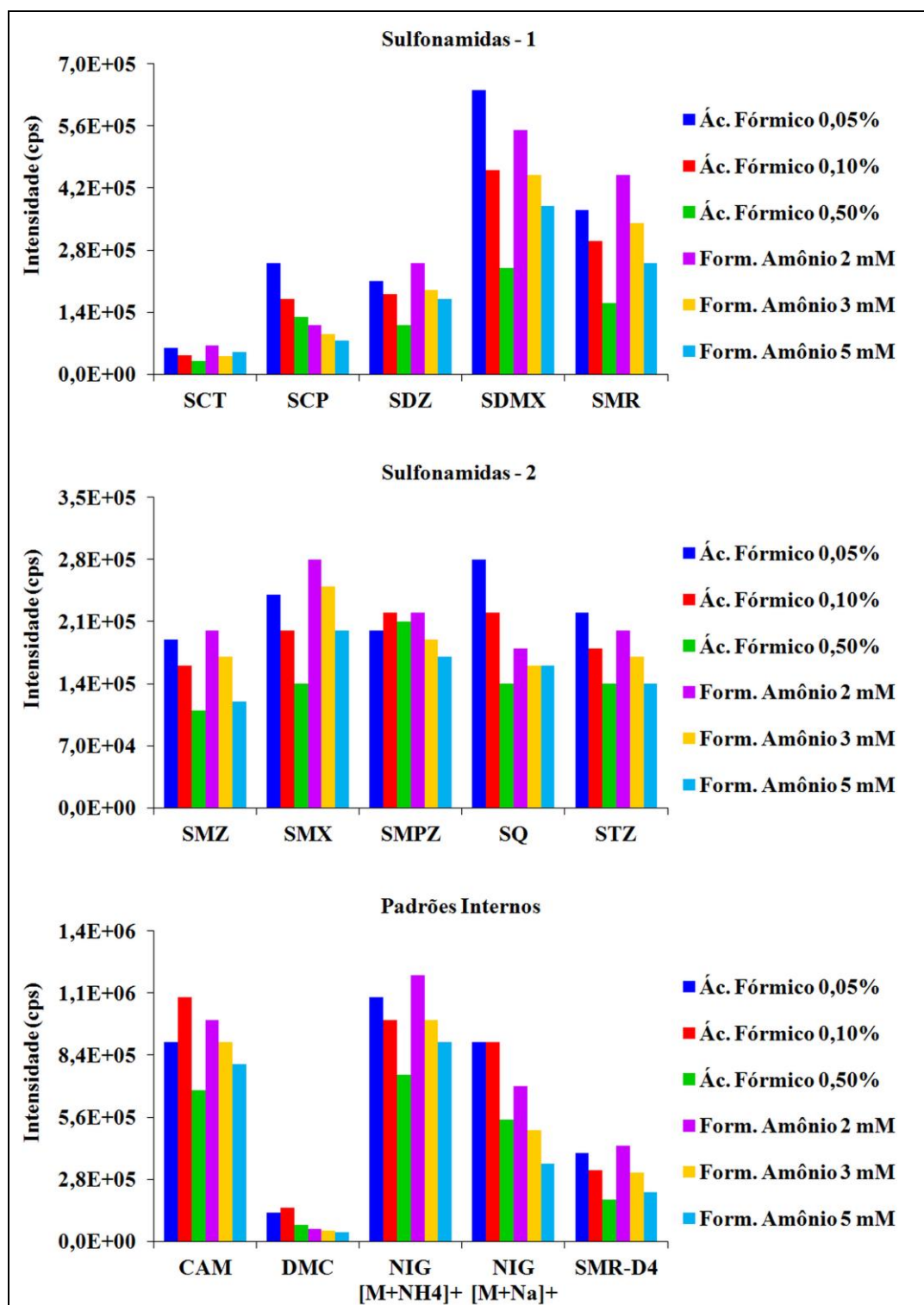


FIGURA 10 – INTENSIDADE DE SINAL DAS SULFONAMIDAS E PADRÕES INTERNOS UTILIZANDO COMO ADITIVO ÁCIDO FÓRMICO E FORMIATO DE AMÔNIO

Nota: SCT - sulfacetamida; SCP - sulfaclopiridazina; SDZ - sulfadiazina; SDMX - sulfadimetoxina; SMR - sulfamerazina; SMZ - sulfametazina; SMX - sulfametoxazol; SMPZ - sulfametoxipiridazina; SQ - sulfaquinoxalina; STZ - sulfatiazol; CAM - cambendazol; DMC - demeclociclina; NIG [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> - nigericina aduto de amônio; NIG [M+Na]<sup>+</sup> - nigericina aduto de sódio; SMR-D4 - sulfamerazina deuterada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1.1.2 Análise por *Multiple Reaction Monitoring* (MRM)

Uma vez otimizada a ionização dos analitos a próxima etapa consistiu na realização do experimento de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). A concentração dos analitos que promoveu uma intensidade de sinal adequada para realização desse experimento foi de 2000 ng mL<sup>-1</sup> para o lasalocid, narasina e nigericina (padrão interno) e 250 ng mL<sup>-1</sup> para os demais. Nessas concentrações os parâmetros individuais de cada analito foram otimizados (*dwell time*, DP, EP, CEP, CE e CXP) sendo obtidos ao término do experimento dois íons fragmentos mais intensos de cada analito (Tabela 18). O íon de maior intensidade foi utilizado para quantificação e o segundo maior em intensidade para qualificação do sinal analítico.

TABELA 18 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO (continua)

Compostos	Íon precursor (m/z)	Íon fragmento (m/z)	<i>Dwell time</i> (ms)	DP <sup>a</sup> (V)	EP <sup>b</sup> (V)	CEP <sup>c</sup> (V)	CE <sup>d</sup> (eV)	CXP <sup>e</sup> (V)
CTC <sup>f</sup>	478,8	444,0	150	31	9,5	22	25	32
		462,0	150	31	9,5	22	23	8
DXC <sup>f</sup>	445,0	428,1	200	26	4,5	28	21	34
		154,1	200	51	8	22	45	4
ERY <sup>f</sup>	734,1	158,2	150	36	8,5	28	43	4
		116,2	150	36	8,5	28	59	4
FLU <sup>f</sup>	314,1	282,1	200	46	9,5	26	27	6
		123,1	200	46	9,5	26	47	4
LAS <sup>g</sup>	613,2	377,3	150	91	11	24	47	8
		595,5	150	91	11	24	31	42
LIN <sup>f</sup>	407,1	126,1	150	41	9	20	37	4
		70,1	150	41	9	20	89	4
NAR <sup>g</sup>	787,3	431,4	250	111	10,5	30	59	8
		531,4	250	111	10,5	30	51	4
OTC <sup>f</sup>	460,9	426,1	200	31	4,5	20	25	34
		201,1	200	31	4,5	20	51	4
SCT <sup>f</sup>	215,0	156,1	150	21	10,5	14	13	4
		92,1	150	21	10,5	14	29	4
SCP <sup>f</sup>	284,9	156,0	150	26	9	16	19	4
		92,1	150	26	9	16	39	4
SDZ <sup>f</sup>	251,1	156,1	150	31	9,5	16	19	4
		92,0	150	31	9,5	16	37	4



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 18 – ÍONS MOLECULARES, TRANSIÇÕES MONITORADAS E PARÂMETROS AJUSTADOS NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS E ANTIPARASITÁRIOS EM OVO (conclusão)

Compostos	Íon precursor (m/z)	Íon fragmento (m/z)	Dwell time (ms)	DP <sup>a</sup> (V)	EP <sup>b</sup> (V)	CEP <sup>c</sup> (V)	CE <sup>d</sup> (eV)	CXP <sup>e</sup> (V)
SDMX <sup>f</sup>	311,0	156,1	250	41	10	16	25	4
		92,1	250	41	10	16	43	4
SMR <sup>f</sup>	265,0	156,1	250	36	10	16	21	4
		108,1	250	36	10	16	33	4
SMZ <sup>f</sup>	279,0	186,2	150	46	10,5	16	21	4
		108,2	150	46	10,5	16	37	4
SMX <sup>f</sup>	253,9	156,0	150	31	9,5	16	19	4
		92,1	150	31	9,5	16	35	4
SMPZ <sup>f</sup>	281,0	156,1	150	56	12	14	21	4
		92,2	150	56	12	14	41	4
SQ <sup>f</sup>	301,0	156,0	200	31	10	16	21	4
		92,1	200	31	10	16	41	4
STZ <sup>f</sup>	255,9	156,1	250	46	11,5	16	19	4
		108,2	250	46	11,5	16	31	4
TC <sup>f</sup>	445,0	410,0	250	36	9	20	23	8
		428,1	250	45	4,5	21	20	32
TIA <sup>f</sup>	494,1	192,2	150	41	10	24	27	4
		119,1	150	41	10	24	51	4
TMP <sup>f</sup>	291,0	230,1	150	56	10	18	27	4
		123,1	150	56	10	18	31	4
TYL <sup>f</sup>	916,1	174,2	200	71	11,5	32	51	4
		101,3	200	71	11,5	32	67	4
CAM <sup>*f</sup>	303,0	217,1	150	41	9	22	39	4
		261,1	150	41	9	22	21	4
DMC <sup>*f</sup>	464,8	448,0	150	31	8,5	22	23	8
		430,0	150	31	8,5	22	27	8
NIG <sup>*g</sup>	747,3	703,5	150	126	12	32	45	58
		501,2	150	101	9	34	59	44
SMR-D4 <sup>*f</sup>	269,0	96,1	150	51	10,5	16	39	4
		160,0	150	51	10,5	16	23	4

Nota: <sup>a</sup>DP: potencial de desagrupamento; <sup>b</sup>EP: potencial de entrada; <sup>c</sup>CEP: potencial de entrada na cela de colisão; <sup>d</sup>CE: energia de colisão; <sup>e</sup>CXP: potencial de saída da cela de colisão; <sup>f</sup>[M+H]<sup>+</sup>; <sup>g</sup>[M+Na]<sup>+</sup>; DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraclina; CTC: clortetraclina; TC: tetraciclina; TYL: tilosina; TIA: tiamulina; CAM: cambendazol; DMC: demeclociclina; SMR-D4: sulfamerazina deuterada; NIG: nigericina; \*: padrão interno.

O ensaio demonstrou ainda que tanto o íon precursor quanto os principais íons fragmentos da tetraciclina e da doxiciclina são idênticos, pois se tratam de isômeros de posição. Entretanto, a abundância relativa dos íons fragmentos varia significativamente. O íon fragmento  $m/z$  428 ( $[M+H-NH_3]^+$ ) é cerca de 4 vezes mais abundante para a doxiciclina ( $1,9 \times 10^6$  cps) quando comparado à tetraciclina ( $4,9 \times 10^5$  cps). Já o íon fragmento de  $m/z$  410 ( $[M+H-H_2O-NH_3]^+$ ) é o terceiro mais abundante para a tetraciclina ( $4,7 \times 10^5$  cps) e não é observado para a doxiciclina. Além disso, somente a doxiciclina apresenta o íon fragmento  $m/z$  154,1 (Figura 11). Em virtude disso, os íons fragmentos  $m/z$  428 e 410 foram selecionados para a quantificação da doxiciclina e tetraciclina, respectivamente. É importante destacar que para a análise simultânea desses analitos é necessário uma adequada separação cromatográfica.

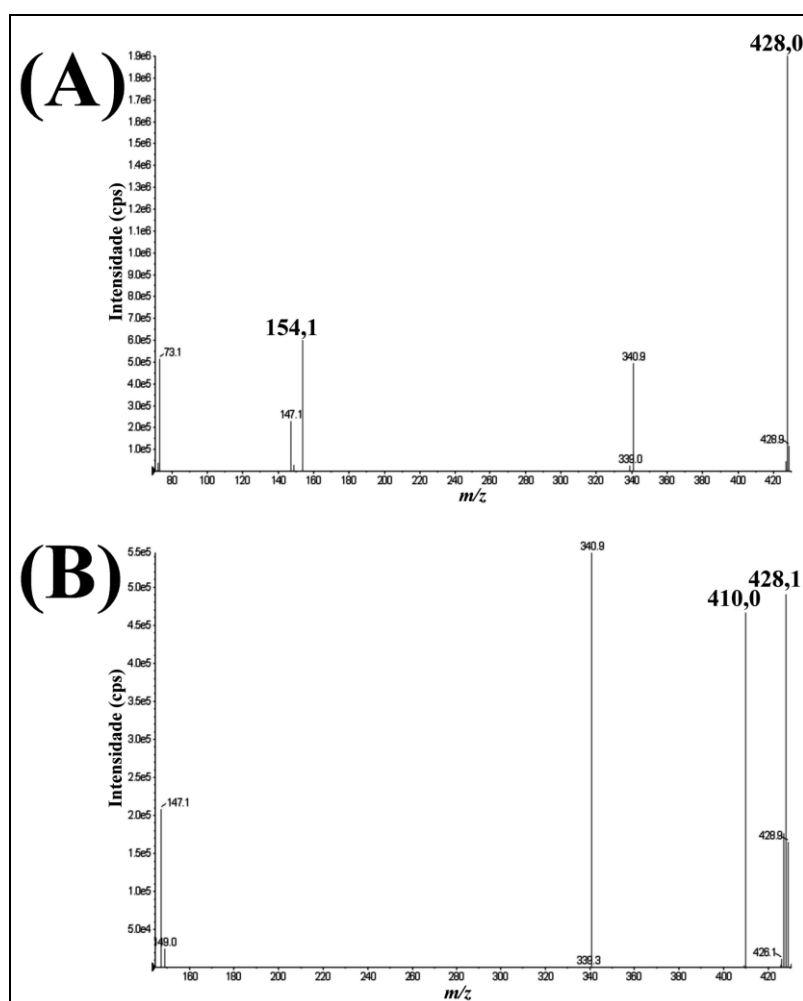


FIGURA 11 – ÍONS FRAGMENTOS DA DOXICICLINA (A) E DA TETRACICLINA (B) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM

Outro importante detalhe observado com o experimento de MRM foi o perfil de fragmentação bem definido das sulfonamidas, uma vez que os espectros apresentaram como principais íons fragmentos o  $m/z$  92, 108 e 156. O espectro de fragmentação da sulfacetamida é apresentado na Figura 12.

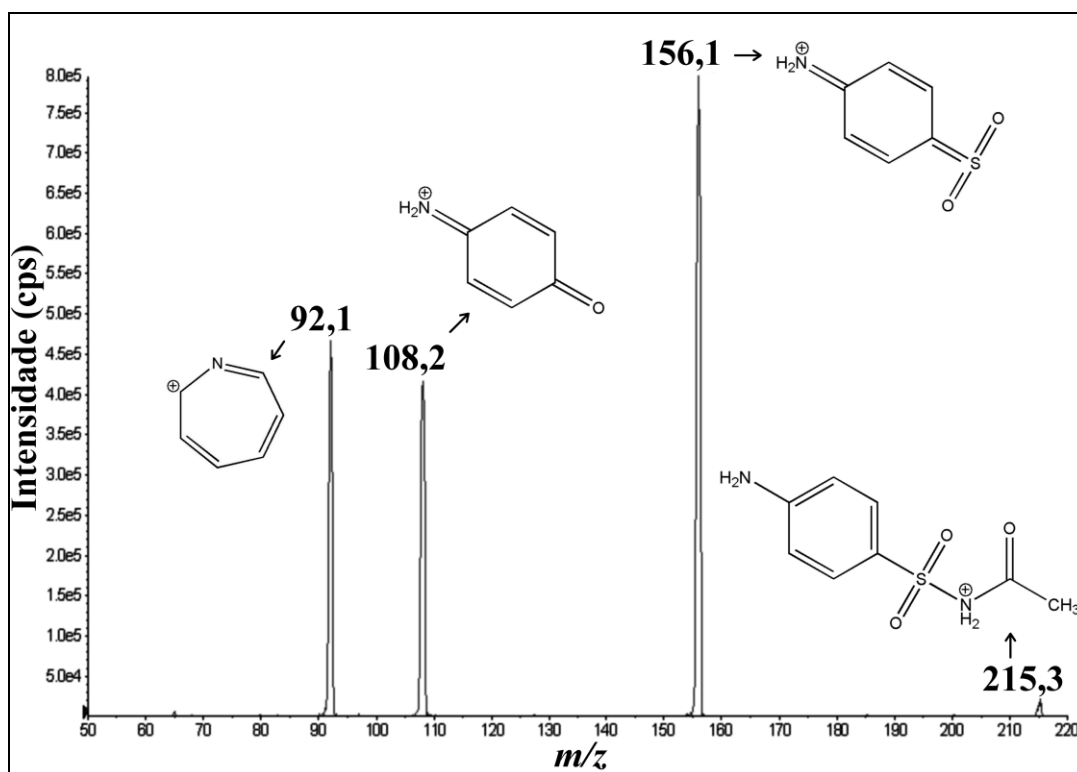


FIGURA 12 – ÍONS FRAGMENTOS DA SULFACETAMIDA ( $M/Z$  215,3) OBTIDOS ATRAVÉS DE MRM

Nota: Estruturas químicas dos fragmentos propostas por De la Cruz *et al.*, 2011.

### 4.1.1.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Concluído o experimento de MRM os parâmetros da fonte de ionização foram otimizados através da Análise por Injeção em Fluxo (FIA). Essa etapa consistiu no acoplamento do cromatógrafo ao espectrômetro de massas, sem a necessidade do uso de coluna cromatográfica. Foram otimizados os parâmetros CUR, CAD, GS1, GS2, IS e temperatura da fonte. Os valores otimizados destes parâmetros são descritos na Tabela 19.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 19 - PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO

Parâmetros da fonte	Valores definidos
Gás de interface (CUR)	12 psi
Gás de colisão (CAD)	10 psi
Gás de nebulização (GS1)	45 psi
Gás auxiliar (GS2)	50 psi
Voltagem do capilar (IS)	5000 V
Temperatura da fonte	500 °C

### 4.1.2 Otimização da cromatografia

Para a otimização da cromatografia foi utilizada uma coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm de tamanho de partícula), acoplada a uma pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm de tamanho de partícula), mantidas a 35 °C. Os primeiros testes foram realizados com fase móvel composta por água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. A vazão foi mantida em 200 µL min<sup>-1</sup> no modo gradiente e o volume de injeção em 10 µL. A corrida iniciou com 95% de água e após 1 min a proporção foi reduzida para 50%. Após 6 min de corrida o gradiente retornou a condição inicial. Conforme demonstrado na Figura 13, os analitos co-eluíram entre 2 e 5 minutos de corrida e, tanto o lasalocid quanto a narasina e a nigericina (padrão interno) não eluíram em até 11 minutos.

Na tentativa de reduzir a retenção do lasalocid, narasina e nigericina, a proporção de acetonitrila (B) na fase móvel foi aumentada de 50 para 100% entre 1 e 5 minutos. Com essa modificação o lasalocid e a narasina eluíram entre 5 e 7 minutos de corrida. Porém, não ocorreu a eluição da nigericina e os demais analitos co-eluíram no início da corrida, não havendo separação cromatográfica (Figura 14).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

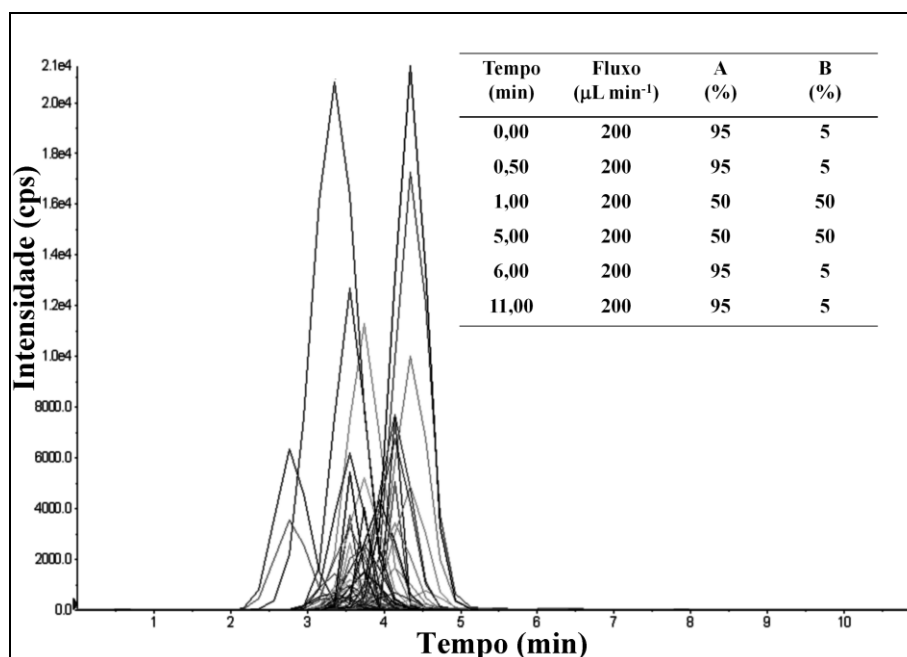


FIGURA 13 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: Concentração -  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  para o lasalocid, narasina e nigericina;  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  para os demais compostos; Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v, coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ), mantidas a  $35^\circ\text{C}$ .

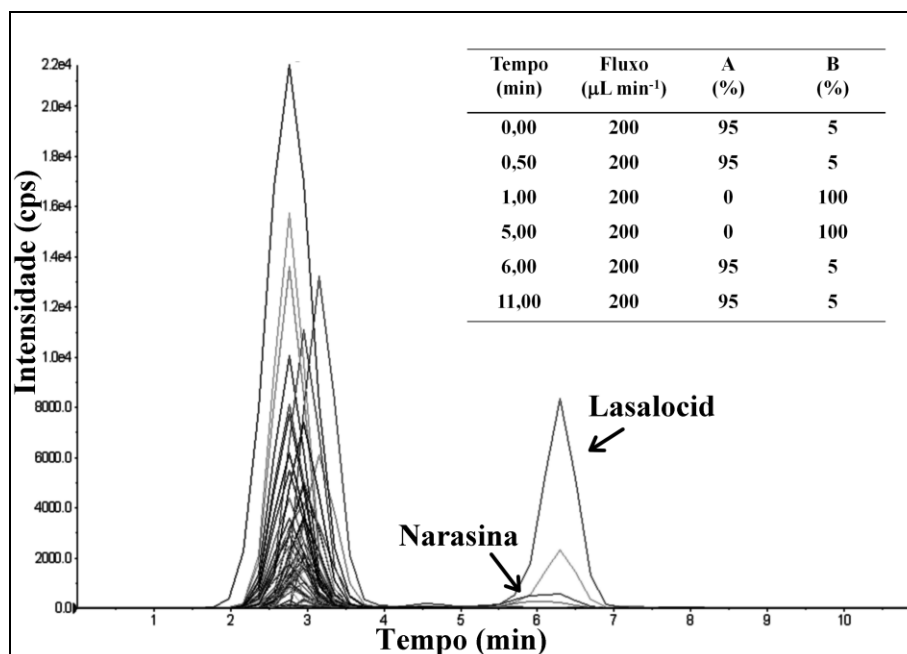


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: Concentração -  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  para o lasalocid, narasina e nigericina;  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  para os demais compostos; Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v, coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ), mantidas a  $35^\circ\text{C}$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando melhorar a separação cromatográfica dos analitos e promover a eluição da nigericina, o gradiente foi modificado. A proporção de água (A) foi mantida em 95% no início da corrida cromatográfica (0 a 0,5 min), a fim de promover retenção dos analitos de maior polaridade. Entre 0,5 a 4 min, aumentou-se a proporção de acetonitrila (B) para 50%, de modo a permitir a eluição e separação dos analitos. Em 7 min, a proporção de acetonitrila atingiu 100%, contribuindo para a eluição do lasalocid e da narasina (entre 8,5 e 10 min). Por fim, entre 10 e 11 min, o gradiente retornou a condição inicial, com 95% de água. Entretanto, apesar das alterações, não foi observado a eluição da nigericina (Figura 15). Além disso, não se obteve adequada separação cromatográfica dos isômeros tetraciclina e doxíciclina (Figura 16).

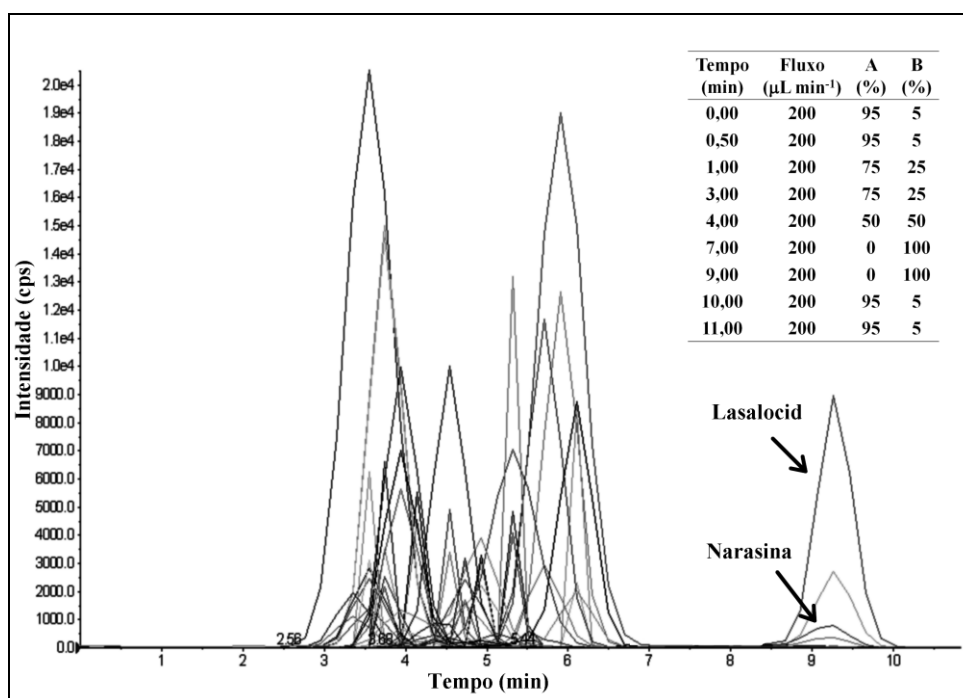


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: Concentração -  $1000 \text{ ng mL}^{-1}$  para o lasalocid, narasina e nigericina;  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  para os demais compostos; Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm;  $3,5 \mu\text{m}$ ), mantidas a  $35^\circ\text{C}$ .

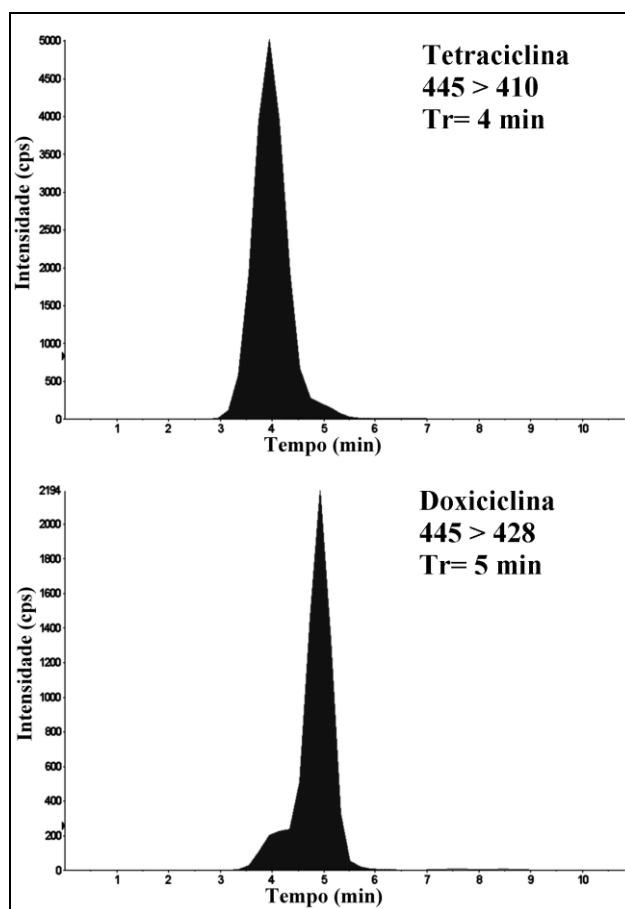


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DOS ÍONS TETRACICLINA E DOXICICLINA

Dados: Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu$ m), mantidas a 35°C.

Na tentativa de garantir a eluição da nigericina e promover a separação dos isômeros de tetraciclina e doxíciclina, a vazão do fluxo foi aumentada de 200 para 400  $\mu$ L min<sup>-1</sup> e o gradiente foi novamente modificado. Entre 0 a 3 min manteve-se a mesma condição do gradiente anterior, iniciando com 5% de acetonitrila (B) e passando para 25% aos 3 min de corrida. A partir de então, essa proporção aumentou progressivamente, até atingir 50% em 8 min e 100% em 10 min. Essa condição se manteve até 17 min. Por fim, entre 18 e 20 min, o gradiente retornou a condição inicial, com 95% de água (A) e 5% de acetonitrila (B).

Conforme demonstrado na Figura 17, a nigericina eluiu em 18 min. Além disso, adequada separação cromatográfica foi obtida para os isômeros de tetraciclina (7 min) e doxíciclina (9,1 min), conforme ilustrado na Figura 18.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

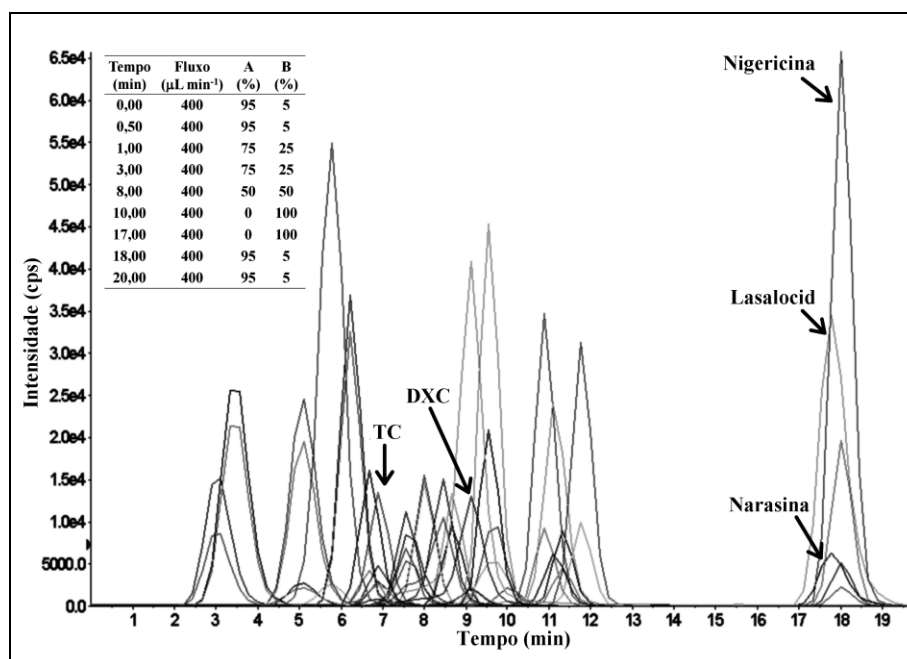


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: TC - tetraciclina; DXC - doxiciclina; Concentração -  $5000 \text{ ng mL}^{-1}$  para o lasalocid, narasina e nigericina;  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  para os demais compostos; Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ), mantidas a 35°C.

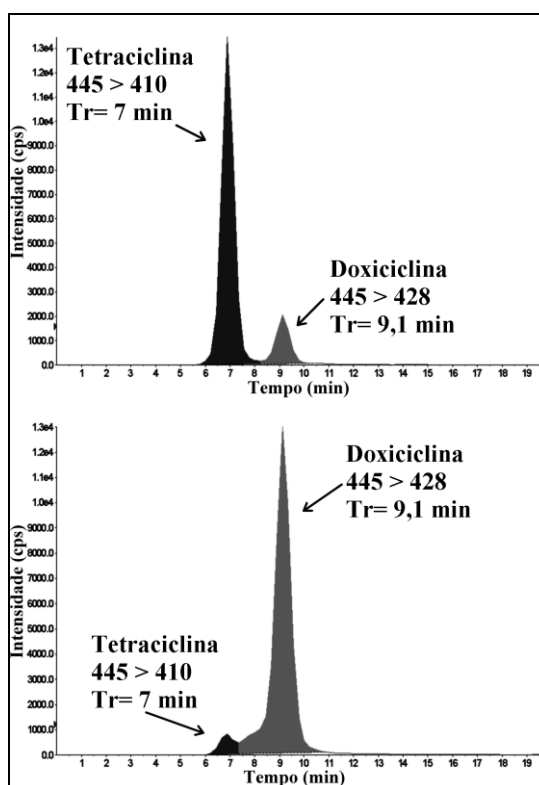


FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DOS ÍONS TETRACICLINA ( $M/Z$  410) E DOXICICLINA ( $M/Z$  428)  
 Dados: Diluente - água/acetonitrila, 70:30 v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5  $\mu\text{m}$ ), mantidas a 35°C.



Apesar do bom resultado, um importante detalhe observado foi com relação a sensibilidade do método para a narasina. No cromatograma apresentado na Figura 17, a concentração desse analito é de  $5000 \text{ ng mL}^{-1}$ , resultando em uma intensidade de aproximadamente 7500 cps. Esse resultado compromete a análise de resíduos, pois demonstra que o método não possui sensibilidade suficiente para análise de amostras com concentração ao redor do limite de máximo de resíduo (LMR), ou seja,  $2 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$  de narasina no ovo (equivalente a  $2 \text{ ng g}^{-1}$  ou  $1 \text{ ng mL}^{-1}$  após a extração, Seção 3.7).

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método para a narasina, modificou-se a composição da fase móvel B, a qual passou a ser acetonitrila/metanol (80:20 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico. O diluente da amostra também foi modificado de água/acetonitrila (70:30 v/v) para acetato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ /acetonitrila/metanol (70:24:6 v/v/v). O metanol contém traços de sódio, o que contribui para a formação dos adutos. Além disso, segundo Spisso (2010) a adição de acetato de sódio no diluente da amostra contribui para o aumento de sinal dos coccidiostáticos (lasalocid, narasina e nigericina).

De modo a manter a separação dos analitos, principalmente dos isômeros doxiciclina e tetraciclina, foi ajustado o gradiente de eluição. Entre 0 a 0,25 min manteve-se 5% de acetonitrila/metanol, 80:20 v/v (B), passando para 25% em 0,5 min de corrida. A partir de então, essa proporção aumentou progressivamente, até atingir 85% em 8 min e 100% em 9 min. Essa condição se manteve até 14 min. Por fim, entre 15 e 20 min, o gradiente retornou a condição inicial, com 95% de água (A) e 5% de acetonitrila/metanol, 80:20 v/v (B).

Como resultado, as modificações na fase móvel e no diluente da amostra contribuíram significativamente para o aumento na sensibilidade do método para a narasina. Conforme apresentado na Figura 19, a intensidade de sinal para a narasina é de aproximadamente 65000 cps para uma concentração de  $150 \text{ ng mL}^{-1}$ , o que corresponde a um aumento de 288 vezes no sinal quando comparado ao cromatograma da Figura 17. Além disso, um bom perfil cromatográfico foi observado para todos os analitos e se manteve a separação dos isômeros de doxiciclina e tetraciclina.

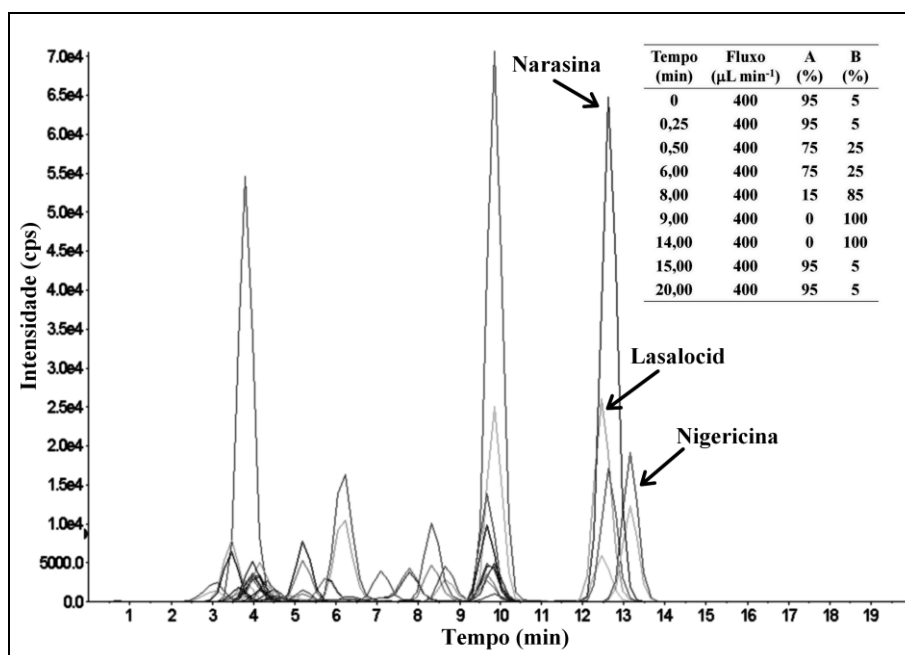


FIGURA 19 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM SOLUÇÃO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/METANOL, 80:20 V/V (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: Concentração - 100 ng mL<sup>-1</sup> para o cambendazol; 150 ng mL<sup>-1</sup> para a narasina; 750 ng mL<sup>-1</sup> para o lasalocid; 1000 ng mL<sup>-1</sup> para a tiamulina; 2000 ng mL<sup>-1</sup> para a nigericina e 500 ng mL<sup>-1</sup> para os demais compostos; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 μm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 μm), mantidas a 35°C.

Na Figura 20 é apresentado o cromatograma do branco de ovo fortificado com os analitos no menor nível de concentração da curva analítica (Tabela 10, seção 3.9.3) e na Figura 21 o cromatograma extraído da narasina. Nessa condição a concentração de narasina é de 1 μg kg<sup>-1</sup>, resultando em um sinal/ruído de 52,3. Esse resultado demonstra a detectabilidade adequada do método desenvolvido para esse analito, possibilitando a determinação de resíduos dessa substância na matriz de ovo.

Nas Figuras 22 a 25 são apresentados os cromatogramas extraídos de cada analito.

Após otimizada as condições cromatográficas, esse método foi selecionado para ser validado segundo os critérios estabelecidos pela Diretiva 2002/657/EC da Comissão das Comunidades Europeias e pelo Guia de Validação de Métodos Bioanalíticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil - RE nº 27, de 17 de maio de 2012 (CCE, 2002; BRASIL, 2012b).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

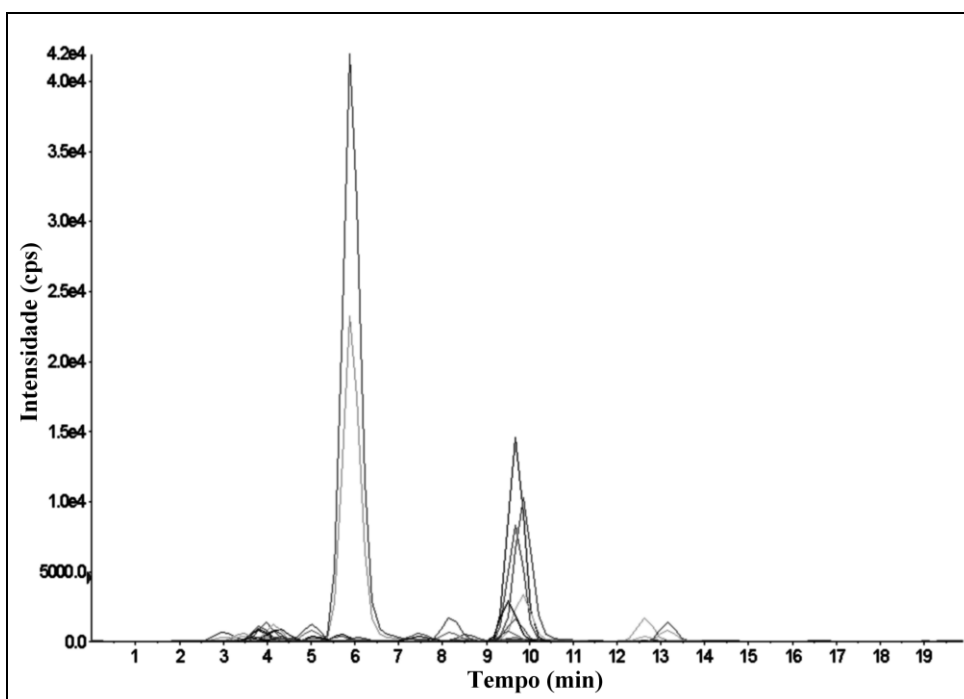


FIGURA 20 - CROMATOGRAMA OBTIDO COM ANALITOS E PADRÕES INTERNOS EM MATRIZ DE OVO, UTILIZANDO (A) ÁGUA E (B) ACETONITRILA/METANOL, 80:20 V/V (AMBOS CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO) NA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.

Dados: Concentração - 1 MNV e 0,5 LMR, conforme descrito na Tabela 10 da seção 3.9.3; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C.

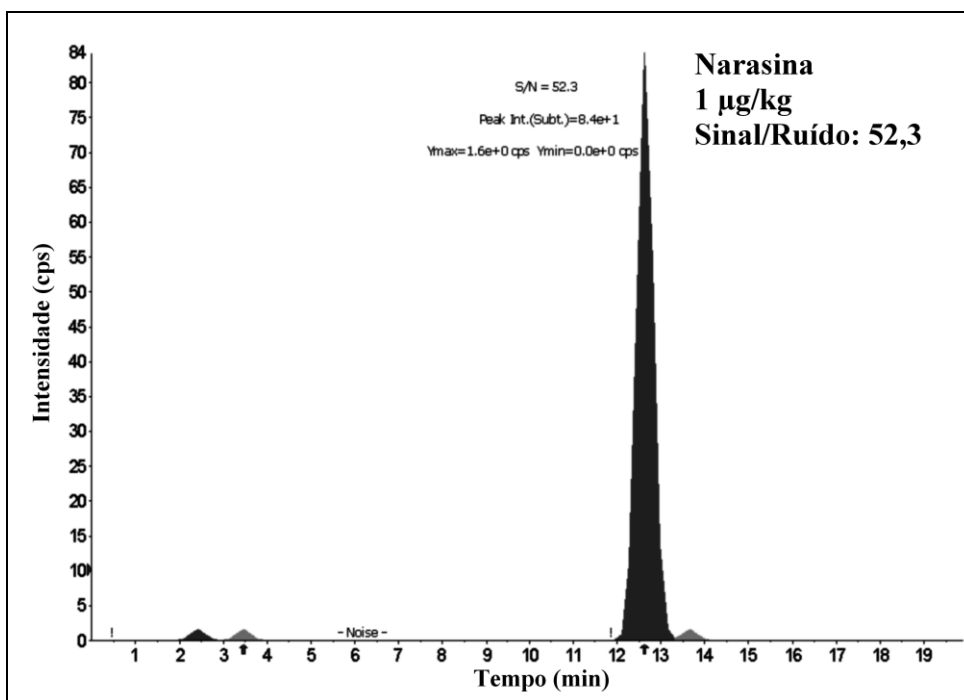


FIGURA 21 - CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DA NARASINA

Dados: Concentração - 1 µg kg<sup>-1</sup>; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C.

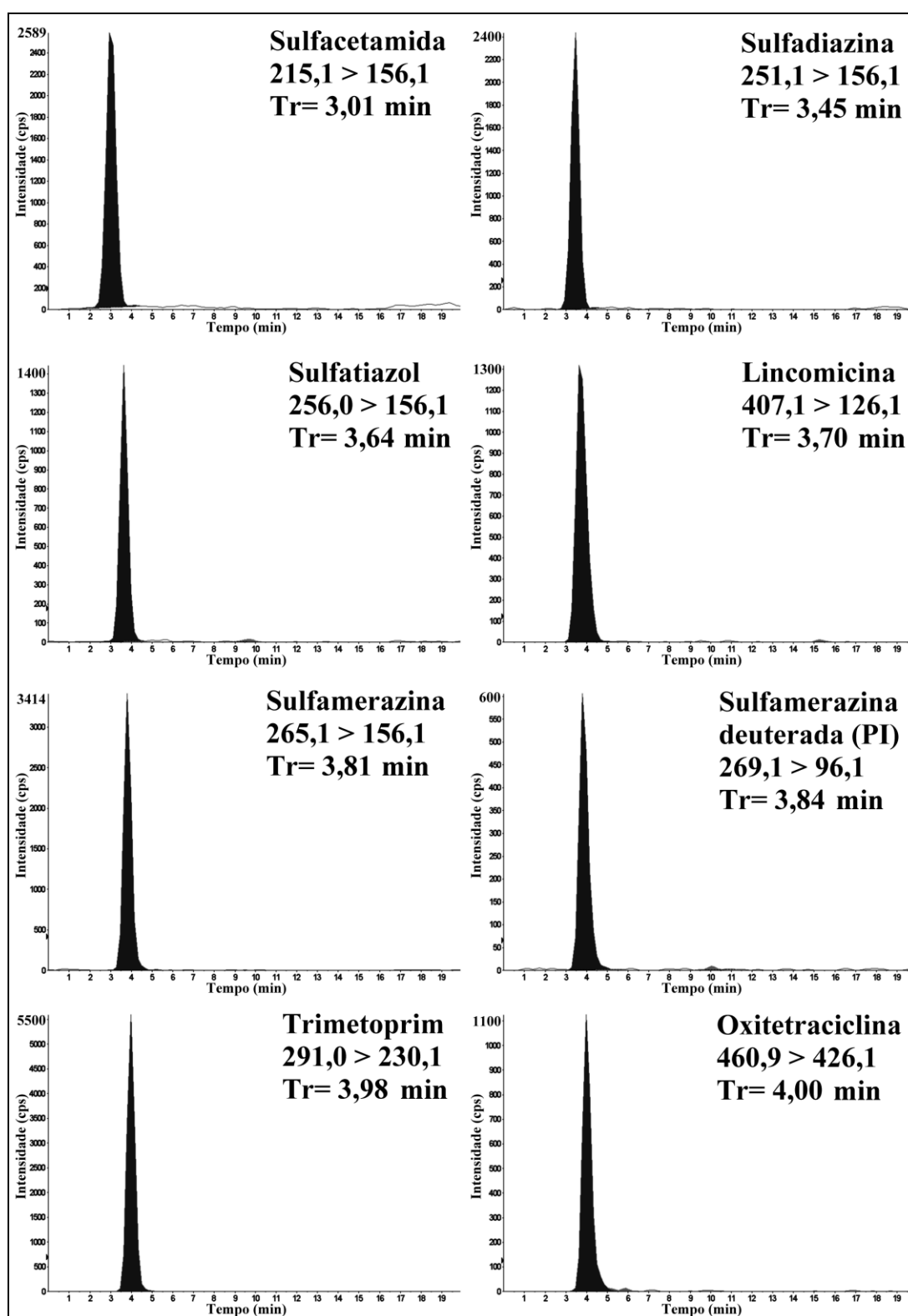


FIGURA 22 - CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS SULFACETAMIDA, SULFADIAZINA, SULFATIAZOL, LINCOMICINA, SULFAMERAZINA, SULFAMERAZINA DEUTERADA, TRIMETOPRIM E OXITETRACICLINA

Dados: Concentração - 1 MNV e 0,5 LMR, conforme descrito na Tabela 10 da seção 3.9.3; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C; PI: padrão interno.

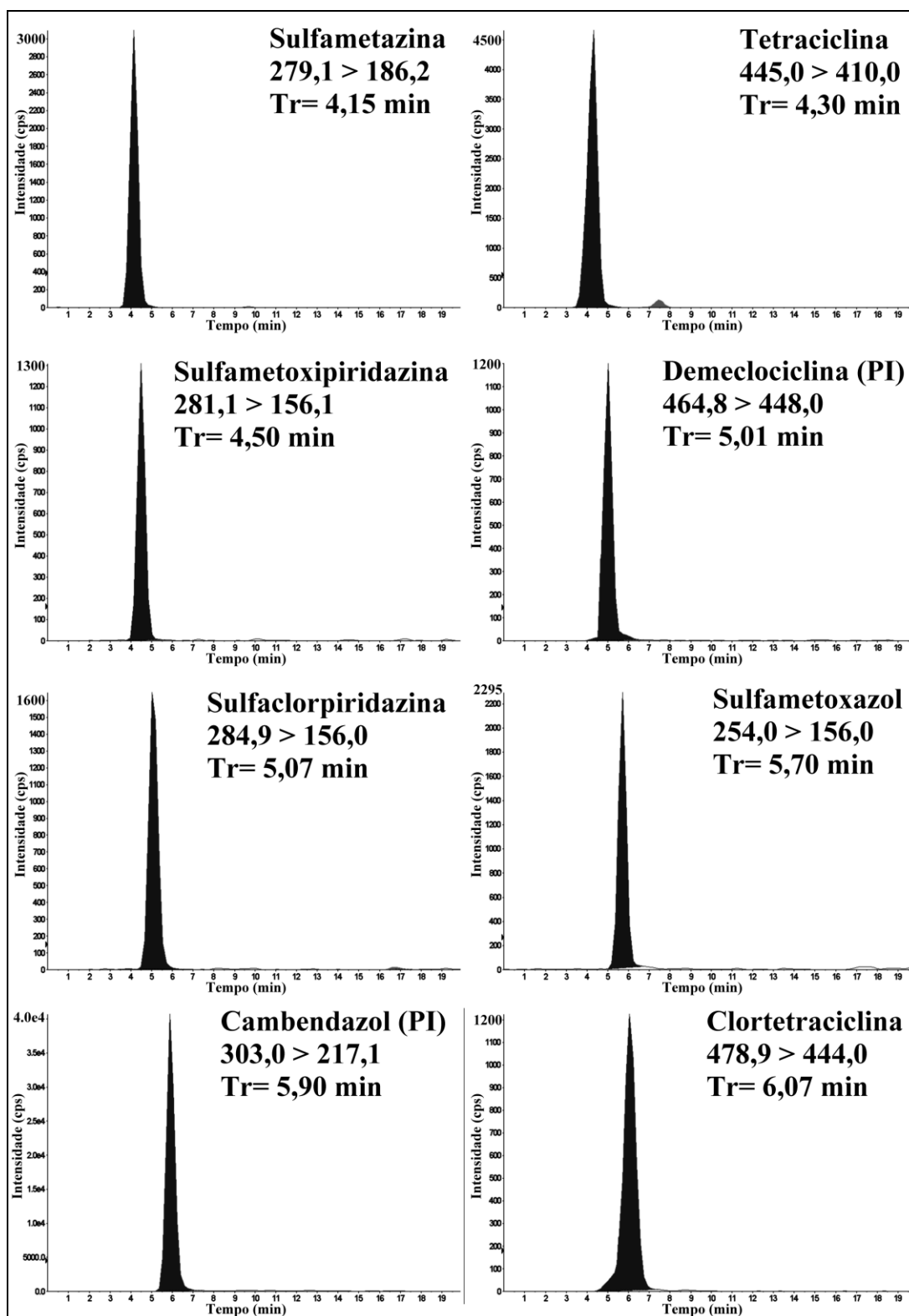


FIGURA 23 - CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS SULFAMETAZINA, TETRACICLINA, SULFAMETOXIPIRIDAZINA, DEMECLOCICLINA, SULFACLOPIRIDAZINA, SULFAMETOXAZOL, CAMBENDAZOL E CLORTETRACICLINA.

Dados: Concentração - 1 MNV e 0,5 LMR, conforme descrito na Tabela 10 da seção 3.9.3; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C; PI: padrão interno.

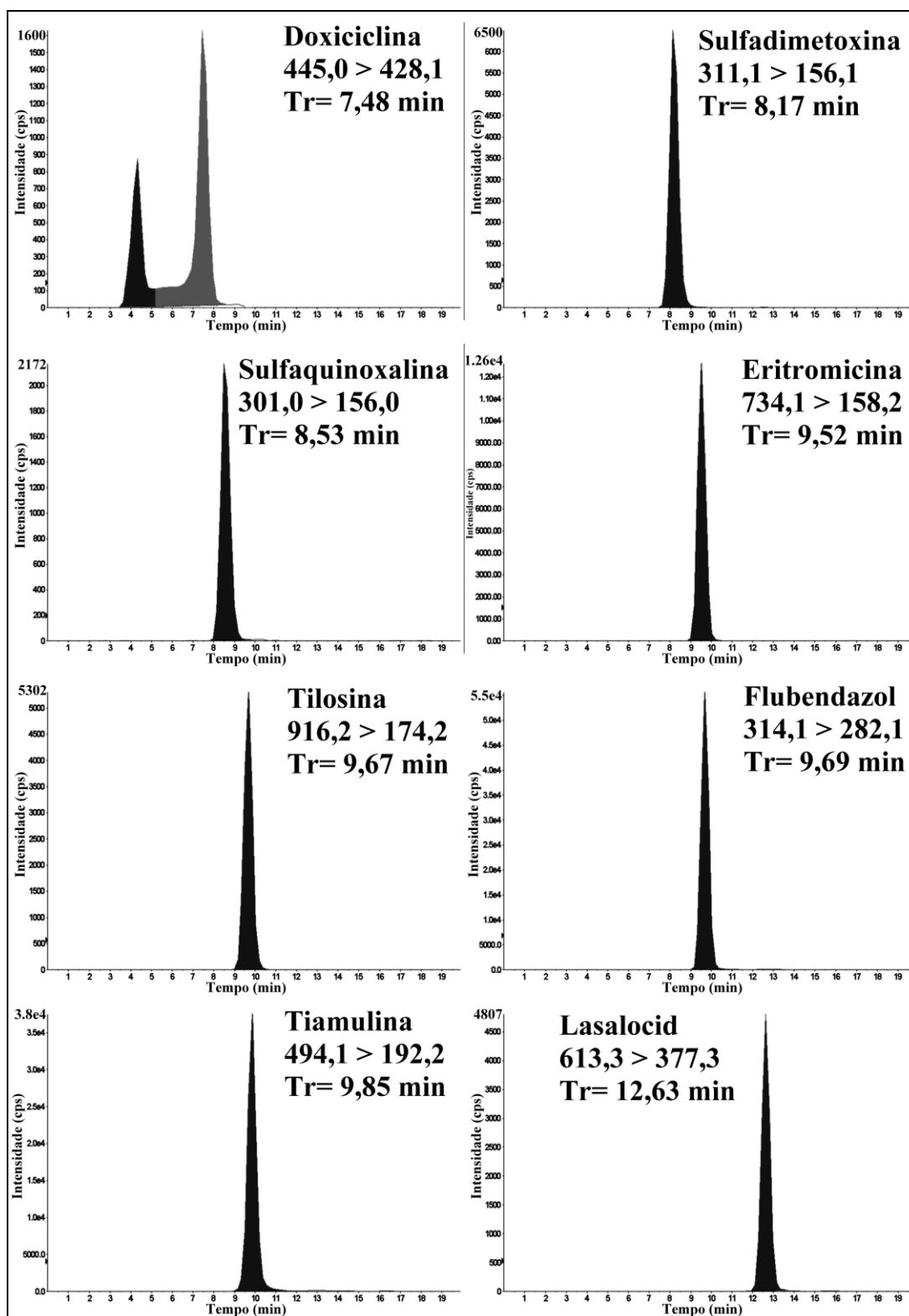


FIGURA 24 - CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS DOXICICLINA, SULFADIMETOXINA, SULFAQUINOXALINA, ERITROMICINA, TILOSINA, FLUBENDAZOL, TIAMULINA E LASALOCID. Dados: Concentração - 1 MNV e 0,5 LMR, conforme descrito na Tabela 10 da seção 3.9.3; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C.

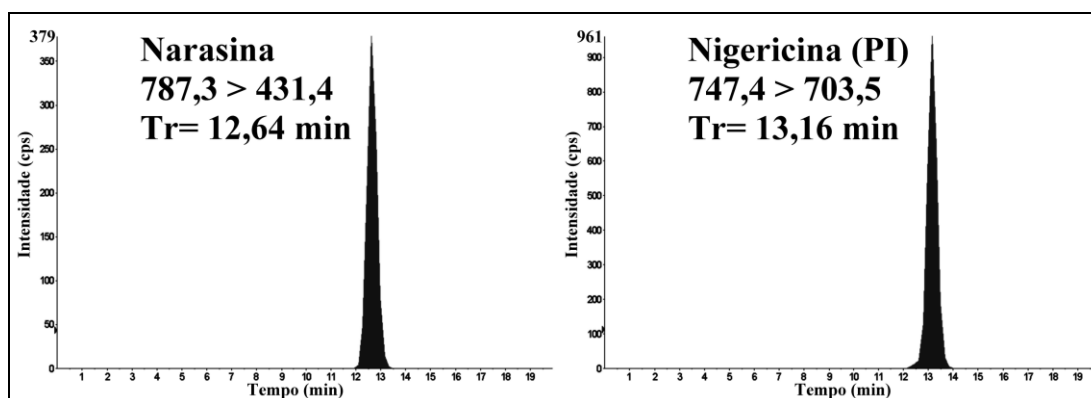


FIGURA 25 - CROMATOGRAMA EXTRAÍDO DOS ÍONS NARASINA E NIGERICINA

Dados: Concentração - 1 MNV e 0,5 LMR, conforme descrito na Tabela 10 da seção 3.9.3; Diluente - acetato de sódio 5 mmol L<sup>-1</sup>/acetonitrila/metanol, 70:24:6 v/v/v; coluna XBridge BEH C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) e pré-coluna XBridge BEH C18 (10 x 2,1 mm; 3,5 µm), mantidas a 35°C; PI: padrão interno.

### 4.1.2.1 Otimização do solvente de limpeza do injetor automático

De modo a evitar a contaminação sucessiva das amostras, foi necessário otimizar o solvente de limpeza do injetor automático. Para isso, foi preparada uma solução contendo todos os analitos e padrões internos na concentração de 500 ng mL<sup>-1</sup>. Essa solução foi injetada e em seguida, após a limpeza do injetor com o solvente definido, foi injetado apenas o diluente.

Conforme ilustrado na Figura 26, a mistura de acetonitrila/metanol (1:1 v/v) não foi eficiente como solvente de limpeza, pois resíduos dos analitos apareceram no cromatograma do diluente. Em virtude disso, foi avaliada a mistura de acetonitrila/metanol (1:1 v/v) contendo 0,1% de ácido fórmico, a qual promoveu uma excelente limpeza do sistema injetor e foi selecionada para uso.

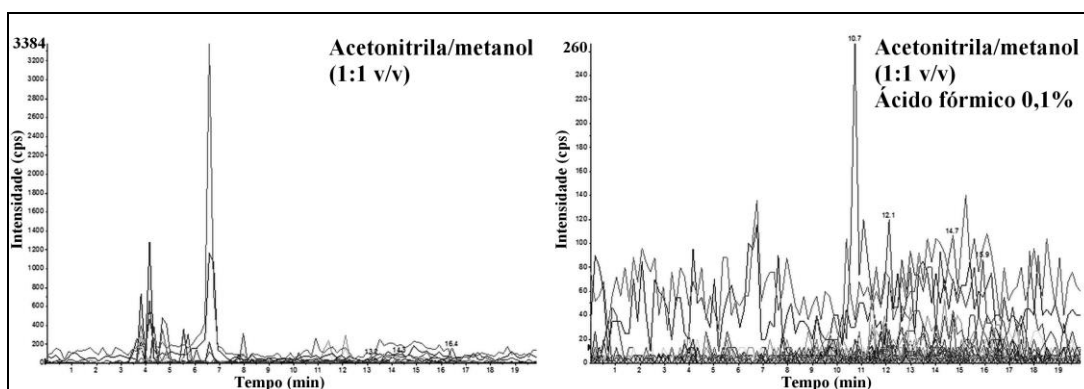


FIGURA 26 – CROMATOGRAMAS DOS DILUENTES AO UTILIZAR ACETONITRILA/METANOL (1:1 V/V) E ACETONITRILA/METANOL (1:1 V/V) CONTENDO 0,1% DE ÁCIDO FÓRMICO NA LIMPEZA DA SERINGA DO INJETOR AUTOMÁTICO.

### 4.2 DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ

Com o objetivo de obter a melhor extração e eliminação de interferentes, foram testadas diferentes técnicas e procedimentos, incluindo a precipitação de proteínas e a extração em fase sólida (SPE). Para a escolha do método mais viável foi levado em consideração, além da eficiência de extração, a rapidez no preparo das amostras e o custo.

A técnica de SPE foi considerada devido a sua capacidade de eliminar possíveis interferentes da matriz, os quais podem prejudicar os resultados das análises. Outro aspecto importante se refere às diferentes características dos analitos em estudo, o que justificou a necessidade de avaliar a recuperação em diferentes valores de pH.

Dentre todos os procedimentos testados com a SPE (Figura 27), o procedimento B foi o que apresentou os piores resultados de recuperação, principalmente para as tetraciclinas (<2%). Ao comparar o procedimento B (sem EDTA) com o procedimento C (com EDTA), fica evidente a importância desse agente quelante para a recuperação de alguns analitos, uma vez que ele os impede de formar complexos com íons metálicos, como cálcio e magnésio, presentes na matriz.



Nos procedimentos D e E foram utilizadas soluções tampão ácidas, com pH 3 e 4,5, respectivamente. Como resultado, foi observada uma baixa recuperação para a eritromicina (<30%), pois esse analito não é estável em meio ácido (FRENICH *et al.*, 2010; SPISSO *et al.*, 2010).

De todas as soluções tampão avaliadas, a de pH 6 foi a que promoveu uma melhor recuperação para a maioria dos analitos, especialmente das sulfonamidas, conforme discutido por Jimenez (2011). Resultado similar foi observado para o procedimento I, o qual não utiliza solução tampão, porém acrescenta-se o acetato de etila como eluente. Entretanto, ao utilizar a técnica de SPE, não foi possível obter uma adequada recuperação para a sulfacetamida, provavelmente devido a sua alta polaridade o que dificulta a sua retenção no cartucho.

Diante desses resultados, foi selecionada para o preparo das amostras a técnica de precipitação de proteínas (A), pois apresentou ótimos valores de recuperação (53 a 118%), rapidez e menor custo quando comparada com a SPE.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

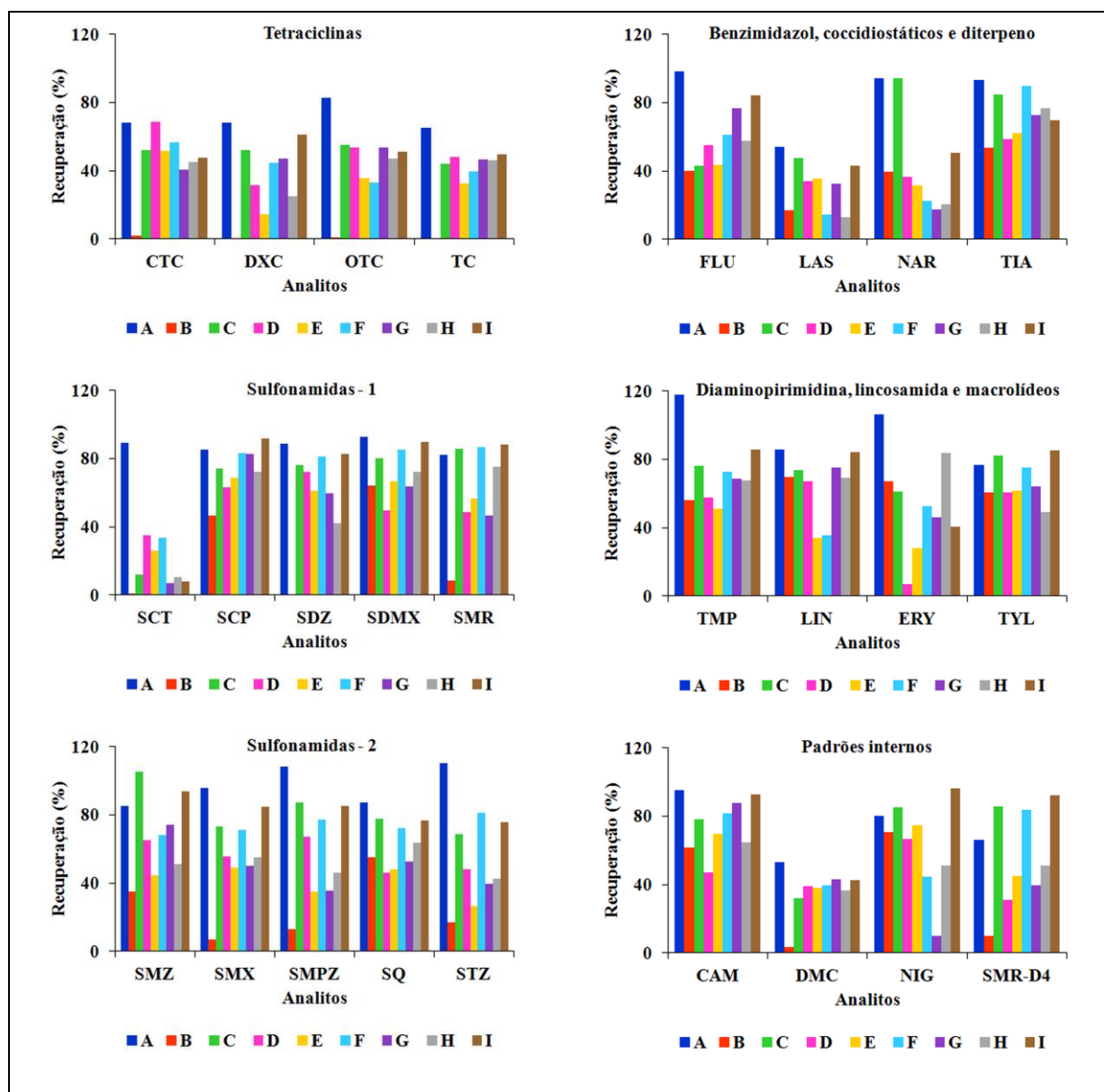


FIGURA 27 – RECUPERAÇÃO DOS ANALITOS DA MATRIZ DE OVO COM DIFERENTES PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

Nota: A - precipitação de proteínas; B - extração em fase sólida (SPE) sem EDTA; C - SPE com EDTA; D - SPE pH 3; E - SPE pH 4,5; F - SPE pH 6; G - SPE pH 7; H - SPE pH 8; I - SPE eluição com acetonitrila e acetato de etila; CTC - clortetraciclina; DXC - doxiciclina; OTC - oxitetraciclina; TC - tetraciclina; SCT - sulfacetamida; SCP - sulfaclopiridazina; SDZ - sulfadiazina; SDMX - sulfadimetoxina; SMR - sulfamerazina; SMZ - sulfametazina; SMX - sulfametoxazol; SMPZ - sulfametoxipiridazina; SQ - sulfaquinoxalina; STZ - sulfatiazol; FLU - flubendazol; LAS - lasalocid; NAR - narasina; TIA - tiamulina; TMP - trimetoprim; LIN - lincomicina; ERY - eritromicina; TYL - tilosina; CAM - cambendazol; DMC - demeclociclina; NIG - nigericina e SMR-D4 - sulfamerazina deuterada.

### 4.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO LC-MS/MS

#### 4.3.1 Seletividade

Os cromatogramas obtidos com as amostras de ovos procedentes de duas fontes diferentes (A e B) são apresentados na Figura 28. Conforme demonstrado, nenhum sinal interferente foi observado, pois a intensidade de sinal foi ao nível de ruído instrumental ( $\text{cps} \leq 140$ ). Portanto, conclui-se que o método é seletivo.

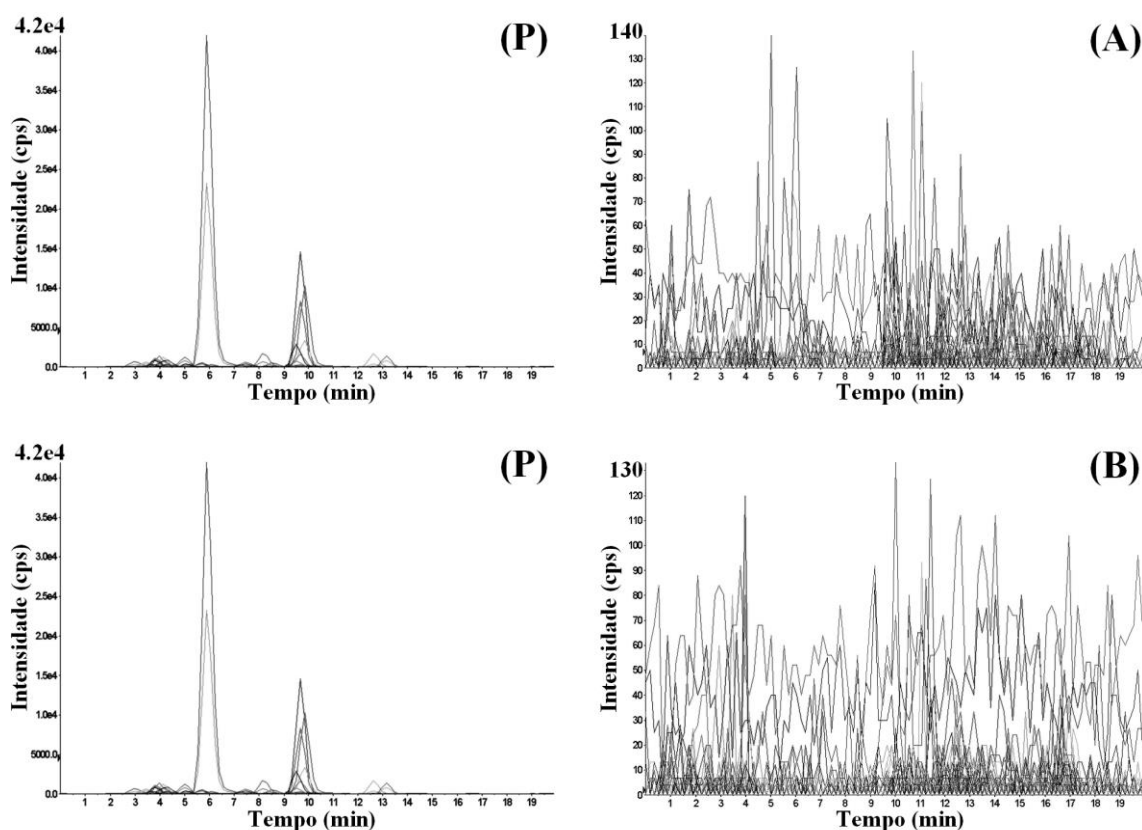


FIGURA 28 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR LC-MS/MS PARA O ESTUDO DE SELETIVIDADE

Dados: (P) cromatograma de uma amostra fortificada com o menor nível de concentração da curva analítica (1 MNV e 0,5 LMR; Seção 3.9.3); (A) cromatograma da amostra procedente da fonte A e (B) cromatograma da amostra procedente da fonte B.

### 4.3.2 Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), limite de decisão ( $CC\alpha$ ) e capacidade de detecção ( $CC\beta$ )

Conforme pode ser observado na Tabela 20 obteve-se uma adequada detectabilidade para o método desenvolvido, com baixos limites de detecção (0,37 a 7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) e de quantificação (1,25 a 20  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Para todos os analitos, tanto o limite de decisão quanto a capacidade de detecção, apresentaram valores de no máximo 15% em relação ao limite de detecção ou limite máximo de resíduo (LMR). Para as substâncias proibidas o limite de decisão e a capacidade de decisão ficaram entre 0,62-7,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 0,65-8,1  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente. Já para as substâncias com LMR o limite de decisão e a capacidade de decisão ficaram entre 2,15-1061,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 2,3-1135,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente.

TABELA 20 – LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR), LIMITE DE DETECÇÃO (LD), LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ), LIMITE DE DECISÃO ( $CC\alpha$ ) E CAPACIDADE DE DETECÇÃO ( $CC\beta$ ) DOS ANALITOS EM ESTUDO (continua)

Analito	LMR	LD	LQ	$CC\alpha$	$CC\beta$
$(\mu\text{g kg}^{-1})$					
Clortetraciclina	200	2,5	12,5	214,5	227,3
Doxiciclina	-	7,5	20,0	7,5	8,1
Eritromicina	150	2,5	10,0	156,5	169,6
Flubendazol	400	1,0	5,0	414,4	443,4
Lasalocid	150	2,5	10,0	159,0	169,0
Lincomicina	50	1,25	3,12	53,8	57,0
Narasina	2	0,25	0,5	2,15	2,3
Oxitetraciclina	200	7,5	20,0	211,8	227,6
Sulfacetamida	-	7,5	20,0	7,5	8,1
Sulfaclopiridazina	-	2,5	10,0	2,5	2,6
Sulfadiazina	-	0,62	2,5	0,62	0,67
Sulfadimetoxina	-	0,62	2,5	0,62	0,65
Sulfamerazina	-	1,25	5,0	1,25	1,3
Sulfametazina	-	0,62	2,5	0,62	0,66
Sulfametoxazol	-	2,5	10,0	2,5	2,6
Sulfametoxipiridazina	-	7,5	20,0	7,5	8,1

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 20 – LIMITE MÁXIMO DE RESÍDUO (LMR), LIMITE DE DETECÇÃO (LD), LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ), LIMITE DE DECISÃO ( $CC\alpha$ ) E CAPACIDADE DE DETECÇÃO ( $CC\beta$ ) DOS ANALITOS EM ESTUDO (conclusão)

Analito	LMR	LD	LQ ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	$CC\alpha$	$CC\beta$
Sulfaquinoxalina	-	2,5	10,0	2,5	2,7
Sulfatiazol	-	7,5	20,0	7,5	8,0
Tetraciclina	200	2,5	12,5	212,6	225,5
Tiamulina	1000	0,37	1,25	1061,5	1135,9
Tilosina	-	0,62	2,5	0,62	0,68
Trimetoprim	200	0,75	2,5	212,2	216,1

### 4.3.3 Linearidade

As curvas de calibração apresentaram linearidade adequada com coeficientes de correlação ( $r$ )  $\geq 0,9934$  para todos os analitos, conforme demonstrado nas Figuras 29 a 50.

Além disso, para cada nível de concentração, as variações de precisão e exatidão foram menores que 15%. Sob todos os aspectos a análise de variância indicou que o ajuste do modelo linear é satisfatório para todas as curvas, pois os valores de p encontrados foram muito menores do que o valor de F crítico, indicando que as variâncias em y são independentes dos níveis de concentração em x. Além de tudo, os valores de F observado na análise da validade da regressão foram maiores que o F crítico, indicando a existência de relação linear entre as variáveis x e y (CHUI; ZUCCHINI; LICHTIG, 2001). Esses resultados são apresentados nas Tabelas 21 a 64.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

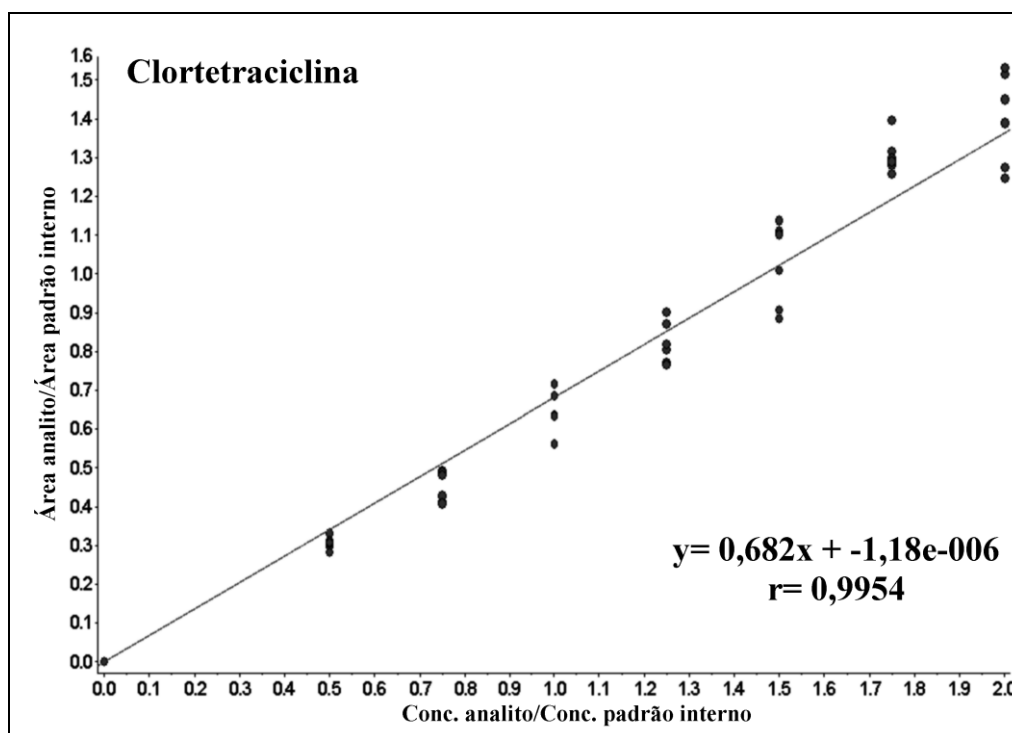


FIGURA 29 – CURVA ANALÍTICA DA CLORTETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 21 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA CLORTETRACICLINA

Analito	Conc. nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Clortetraciclina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	100	89,65	4,72	5,26	-10,35
	150	132,44	11,59	8,75	-11,70
	200	191,63	16,31	8,51	-4,18
	250	241,16	15,91	6,60	-3,54
	300	300,81	32,01	10,64	0,27
	350	383,27	14,19	3,70	9,51
	400	411,04	35,28	8,58	2,76

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 22 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA CLORTETRACICLINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	2,576388	1	2,576388	8,231038	0,005085	3,942303
Dentro dos grupos	29,42283	94	0,313009			
Total	31,99922	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

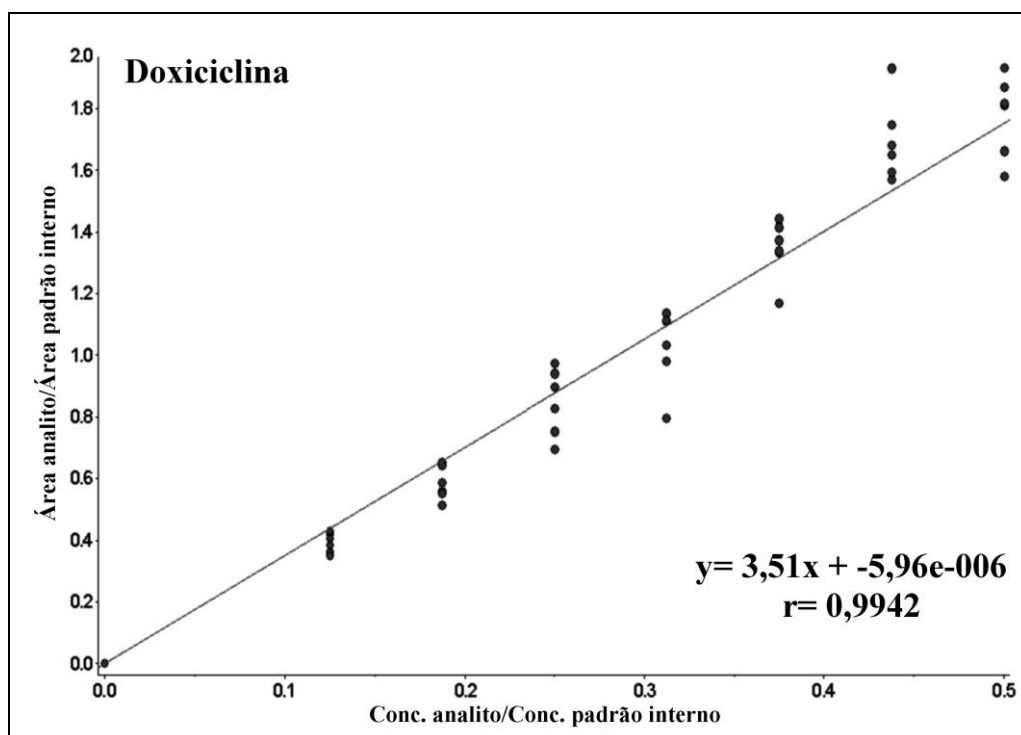


FIGURA 30 – CURVA ANALÍTICA DA DOXICICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 23 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA DOXICICLINA

Analito	Conc. nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Doxiciclina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	22,35	1,81	8,12	-10,61
	37,5	33,33	3,09	9,28	-11,12
	50,0	48,33	6,26	12,95	-3,33
	62,5	58,64	7,34	12,52	-6,18
	75,0	76,72	5,48	7,15	2,29
	87,5	96,68	7,50	7,76	10,49
	100,0	101,45	7,55	7,44	1,45

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 24 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA DOXICICLINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	11,89709	1	11,89709	61,63546	$6,56 \times 10^{-12}$	3,942303
Dentro dos grupos	18,1442	94	0,193023			
Total	30,04129	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

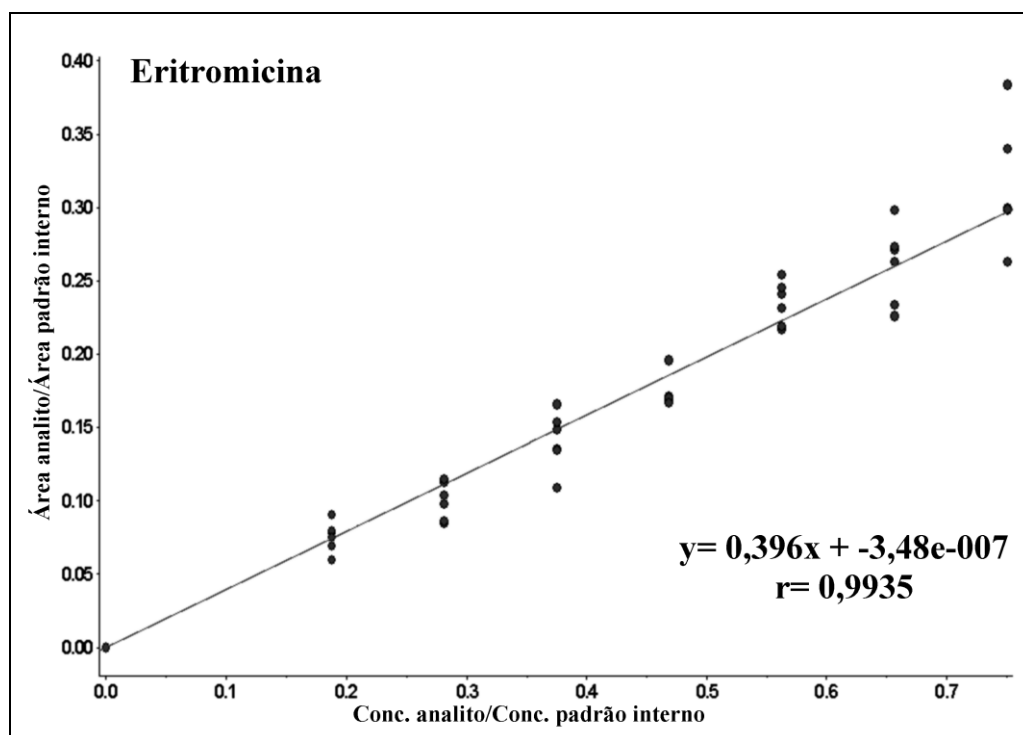


FIGURA 31 – CURVA ANALÍTICA DA ERITROMICINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 25 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA ERITROMICINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	75,0	76,20	10,47	13,73	1,60
	112,5	100,90	12,88	12,77	-10,71
	150,0	142,49	19,80	13,89	-5,00
	187,5	175,49	11,08	6,31	-6,66
	225,0	236,88	15,12	6,38	5,28
	262,5	263,57	27,17	10,31	0,22
	300,0	316,97	42,46	13,40	5,66

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 26 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA ERITROMICINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	1,431418	1	1,431418	42,87986	$3,06 \times 10^{-9}$	3,942303
Dentro dos grupos	3,137913	94	0,033382			
Total	4,569331	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

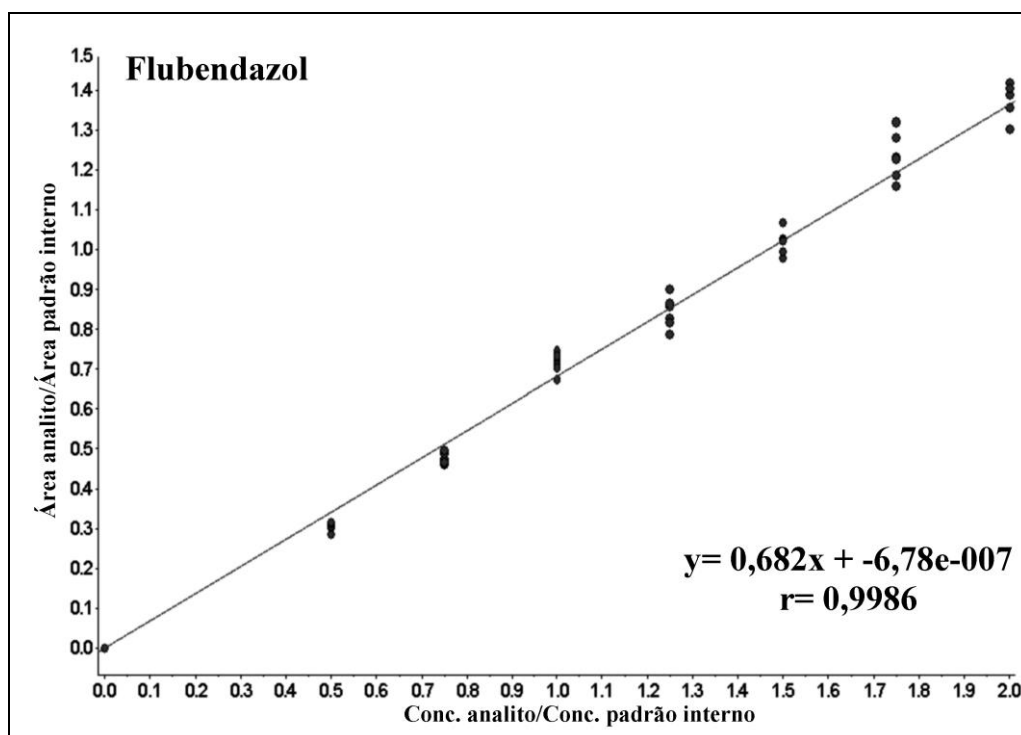


FIGURA 32 – CURVA ANALÍTICA DO FLUBENDAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 27 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO FLUBENDAZOL

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Flubendazol	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	200	179,28	6,39	3,57	-10,36
	300	278,37	8,55	3,07	-7,21
	400	419,80	14,90	3,55	4,95
	500	493,65	23,11	4,68	-1,27
	600	597,70	18,05	3,02	-0,38
	700	723,94	34,59	4,78	3,42
	800	807,26	24,35	3,02	0,91

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 28 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO FLUBENDAZOL

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	2,49593	1	2,49593	8,189959	0,005192	3,942303
Dentro dos grupos	28,64696	94	0,304755			
Total	31,14289	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

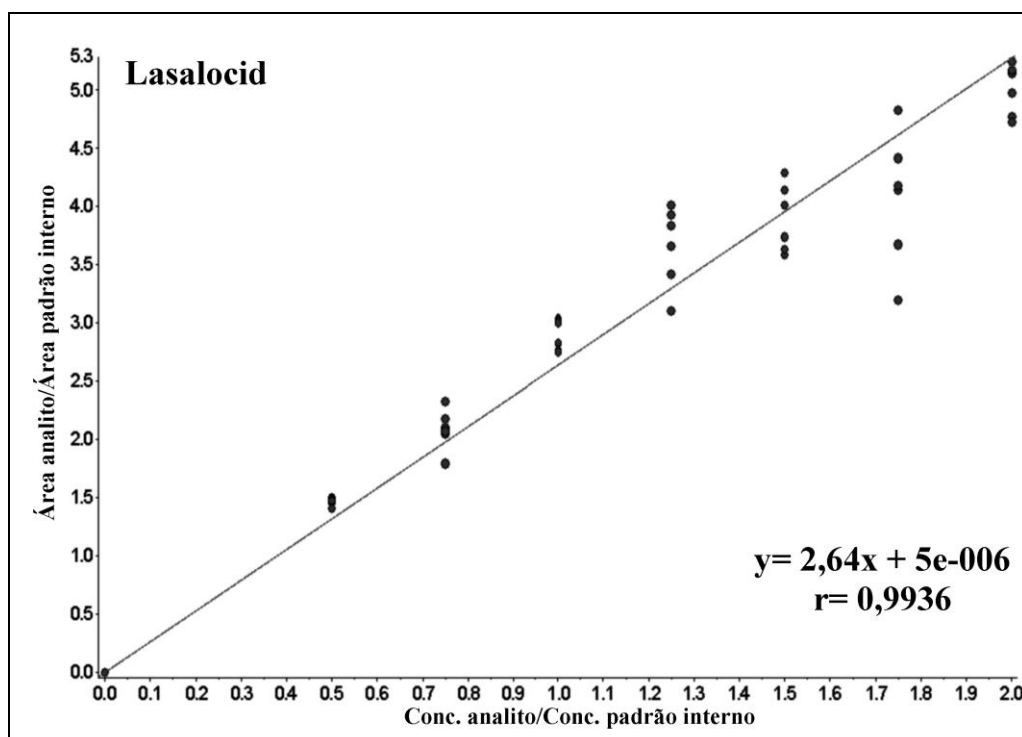


FIGURA 33 – CURVA ANALÍTICA DO LASALOCID, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 29 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO LASALOCID

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Lasalocid	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	75	83,56	1,84	2,20	11,42
	113	115,92	12,48	10,76	2,58
	150	165,24	7,51	4,55	10,16
	188	208,52	19,53	9,37	10,91
	225	222,19	16,60	7,47	-1,25
	263	231,98	32,53	14,02	-11,79
	300	285,09	12,50	4,38	-4,97

Dados: <sup>a</sup>Coeficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 30 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO LASALOCID

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	38,41402	1	38,41402	37,9855	$1,76 \times 10^{-8}$	3,942303
Dentro dos grupos	95,06042	94	1,011281			
Total	133,4744	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

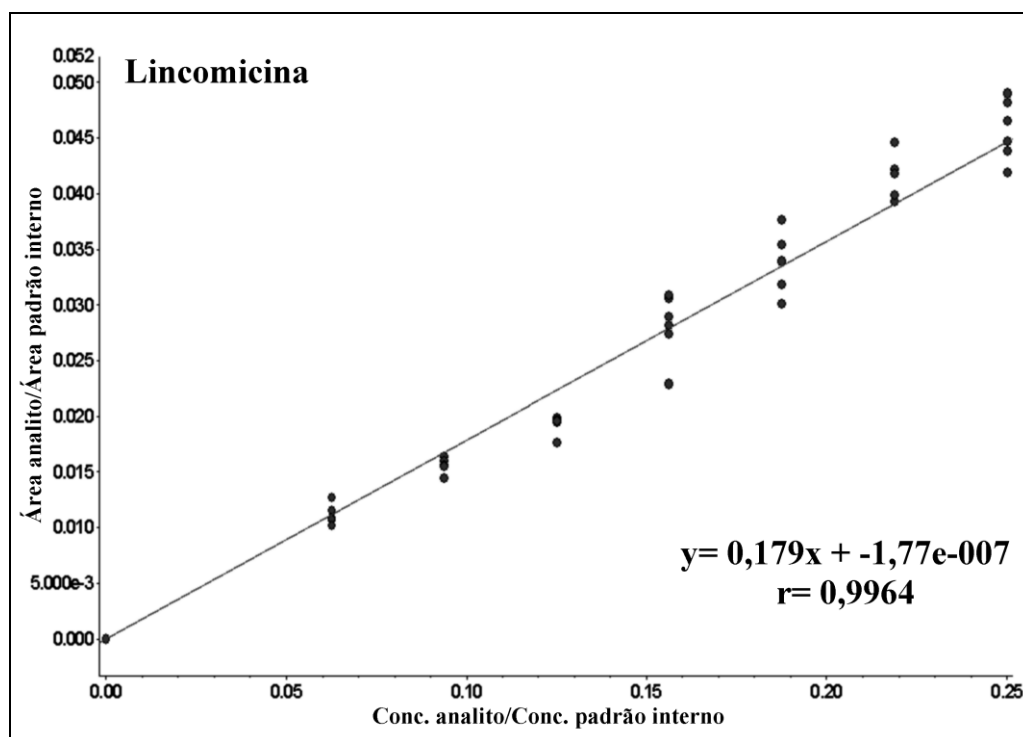


FIGURA 34 – CURVA ANALÍTICA DA LINCOMICINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 31 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA LINCOMICINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Lincomicina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25	24,91	1,96	7,88	-0,35
	37,5	34,92	1,44	4,13	-6,87
	50	43,24	1,81	4,20	-13,51
	62,5	63,07	6,52	10,34	0,91
	75	75,71	5,90	7,80	0,95
	87,5	93,30	4,27	4,58	6,63
	100	102,34	6,09	5,95	2,34

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 32 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA LINCOMICINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	0,303742	1	0,303742	94,24067	$7,68 \times 10^{-16}$	3,942303
Dentro dos grupos	0,302967	94	0,003223			
Total	0,606709	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

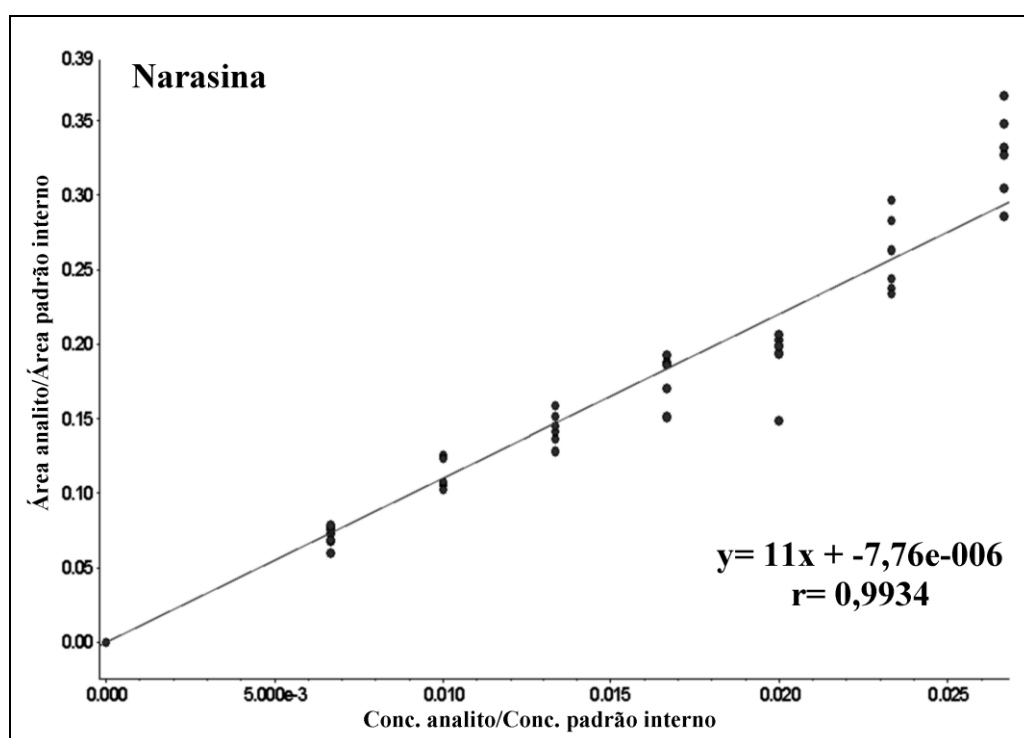


FIGURA 35 – CURVA ANALÍTICA DA NARASINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 33 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA NARASINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Narasina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	1,0	0,96	0,09	9,37	-4,10
	1,5	1,52	0,14	8,92	1,63
	2,0	1,96	0,15	7,58	-2,18
	2,5	2,44	0,21	8,74	-2,43
	3,0	2,63	0,30	11,48	-12,45
	3,5	3,54	0,35	9,97	1,06
	4,0	4,46	0,40	8,89	11,44

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 34 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA NARASINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	0,442307	1	0,442307	108,3384	$2,5 \times 10^{-17}$	3,942303
Dentro dos grupos	0,383768	94	0,004083			
Total	0,826075	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

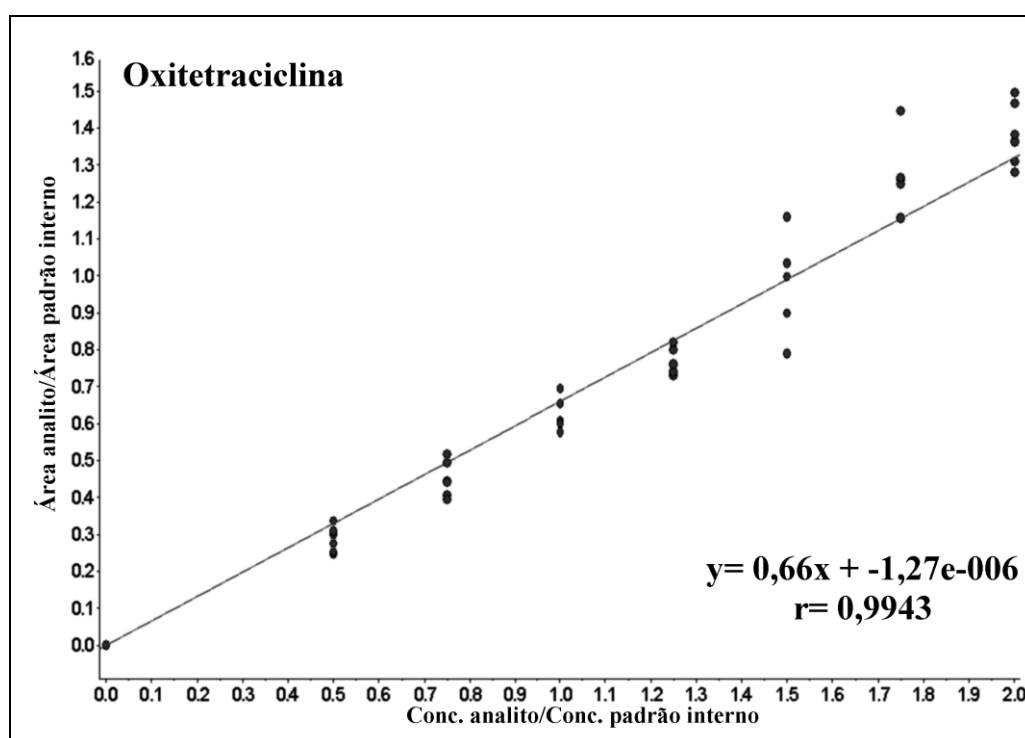


FIGURA 36 – CURVA ANALÍTICA DA OXITETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 35 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA OXITETRACICLINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Oxitetraciclina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	100	86,84	10,64	12,25	-13,16
	150	136,29	14,35	10,53	-9,14
	200	191,29	13,26	6,93	-4,35
	250	231,83	11,02	4,75	-7,27
	300	298,81	38,59	12,91	-0,40
	350	385,98	28,65	7,42	10,28
	400	418,96	25,71	6,14	4,74

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 36 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA OXITETRACICLINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	4,570895	1	4,570895	15,21135	0,00018	3,942303
Dentro dos grupos	28,24628	94	0,300492			
Total	32,81717	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

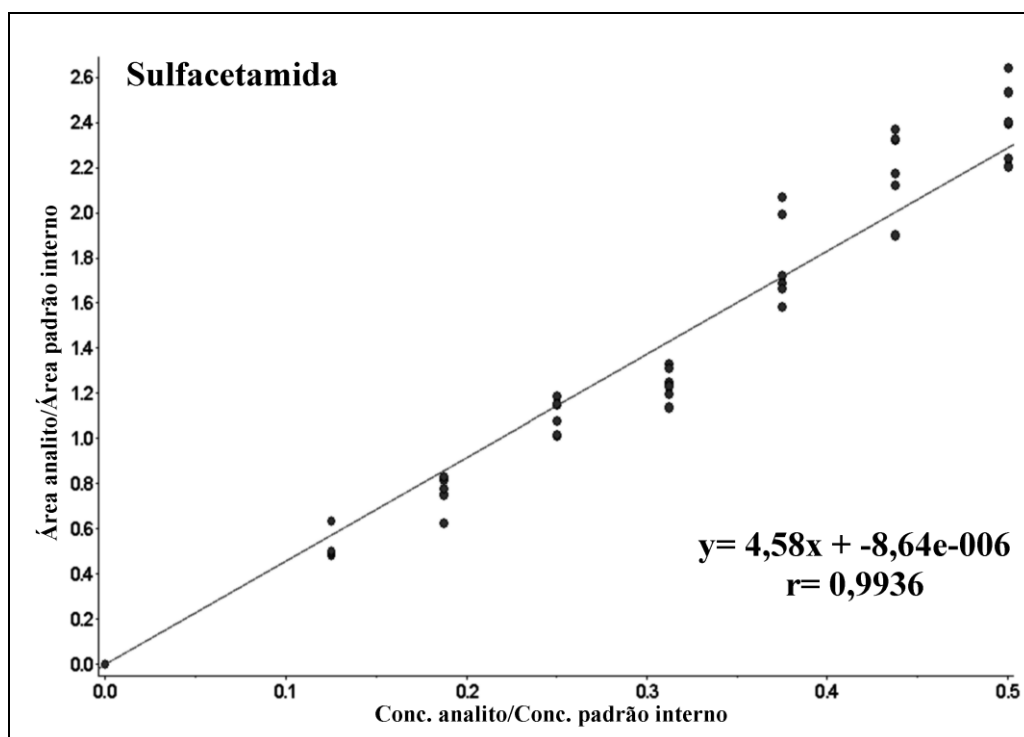


FIGURA 37 – CURVA ANALÍTICA DA SULFACETAMIDA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 37 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFACETAMIDA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfacetamida	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	22,55	2,59	11,46	-9,78
	37,5	33,34	3,20	9,59	-11,10
	50,0	48,04	3,26	6,79	-3,92
	62,5	54,31	3,11	5,72	-13,10
	75,0	78,08	8,60	11,01	4,11
	87,5	96,22	7,74	8,05	9,97
	100,0	104,95	7,32	6,98	4,95

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 38 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFACETAMIDA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	23,85475	1	23,85475	74,68858	$1,41 \times 10^{-13}$	3,942303
Dentro dos grupos	30,02262	94	0,31939			
Total	53,87736	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

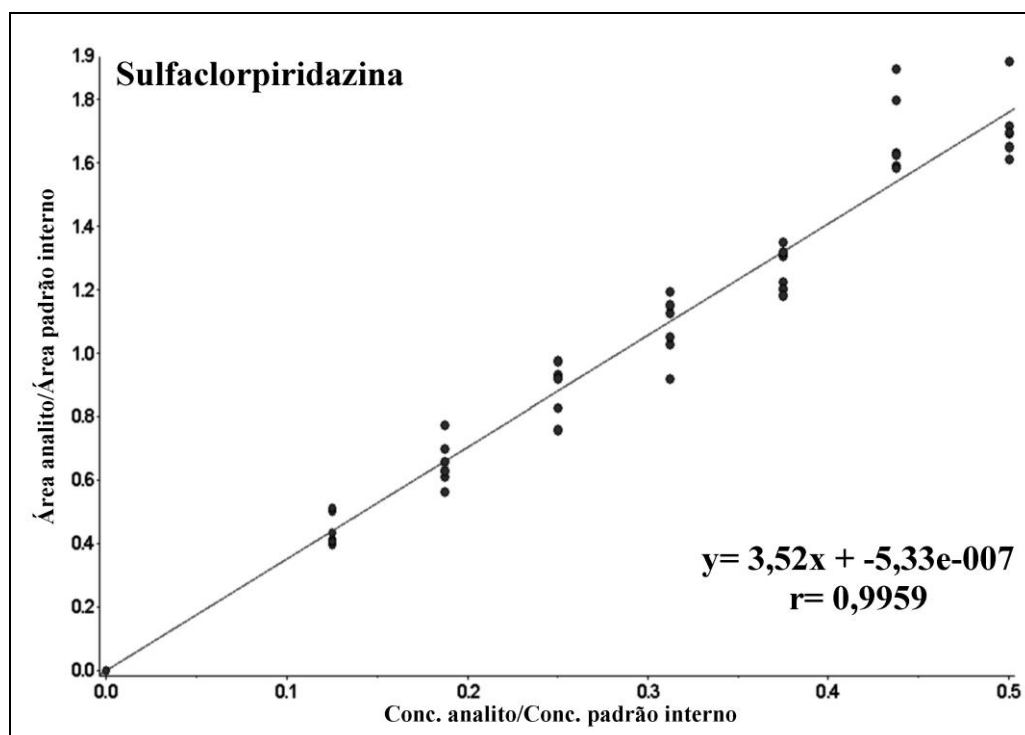


FIGURA 38 – CURVA ANALÍTICA DA SULFACLOPIRIDAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 39 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFACLOPIRIDAZINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfaclopiridazina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	25,25	2,87	11,35	0,99
	37,5	37,18	4,18	11,24	-0,85
	50,0	48,93	5,36	10,96	-2,14
	62,5	61,22	5,63	9,20	-2,04
	75,0	71,78	3,95	5,50	-4,29
	87,5	95,81	7,30	7,62	9,49
	100,0	97,33	6,11	6,28	-2,67

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 40 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFACLOPIRIDAZINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	7,831208	1	7,831208	48,10148	$5,08 \times 10^{-10}$	3,942303
Dentro dos grupos	15,30376	94	0,162806			
Total	23,13497	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

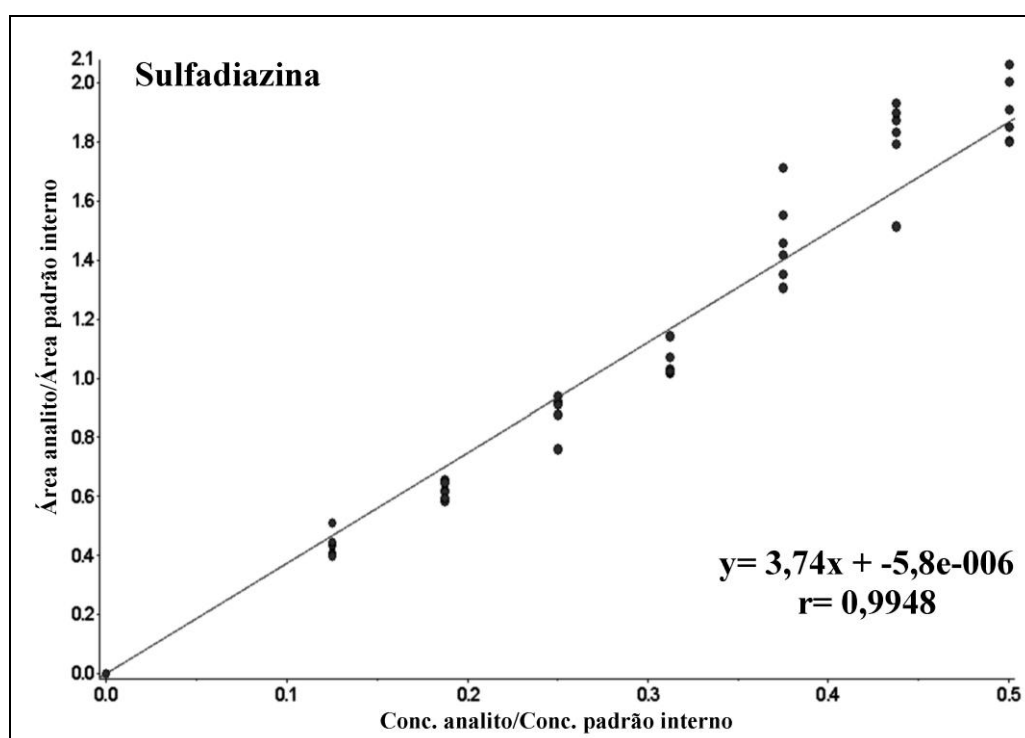


FIGURA 39 – CURVA ANALÍTICA DA SULFADIAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 41 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFADIAZINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfadiazina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	23,52	2,09	8,88	-5,91
	37,5	33,13	1,56	4,71	-11,66
	50,0	47,49	3,53	7,44	-5,03
	62,5	56,24	2,60	4,62	-10,01
	75,0	78,47	7,92	10,10	4,63
	87,5	96,72	8,12	8,39	10,54
	100,0	101,93	5,81	5,70	1,93

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 42 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFADIAZINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	12,96495	1	12,96495	62,65826	$4,8 \times 10^{-12}$	3,942303
Dentro dos grupos	19,45004	94	0,206915			
Total	32,41499	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

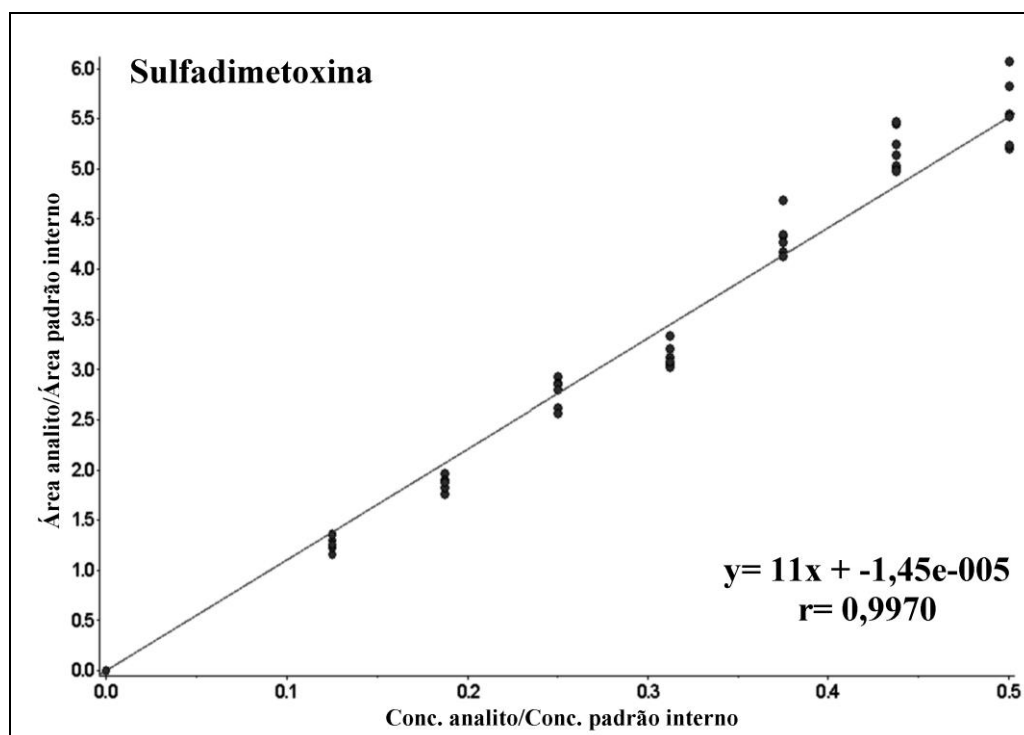


FIGURA 40 – CURVA ANALÍTICA DA SULFADIMETOXINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 43 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFADIMETOXINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfadimetoxina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	23,05	1,40	6,05	-7,79
	37,5	33,78	1,27	3,76	-9,93
	50,0	50,19	2,65	5,28	0,38
	62,5	56,80	2,07	3,65	-9,12
	75,0	78,30	3,62	4,62	4,40
	87,5	94,52	3,74	3,96	8,03
	100,0	100,86	6,08	6,03	0,86

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 44 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFADIMETOXINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	175,501	1	175,501	105,8352	$4,51 \times 10^{-17}$	3,942303
Dentro dos grupos	155,8753	94	1,658248			
Total	331,3763	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

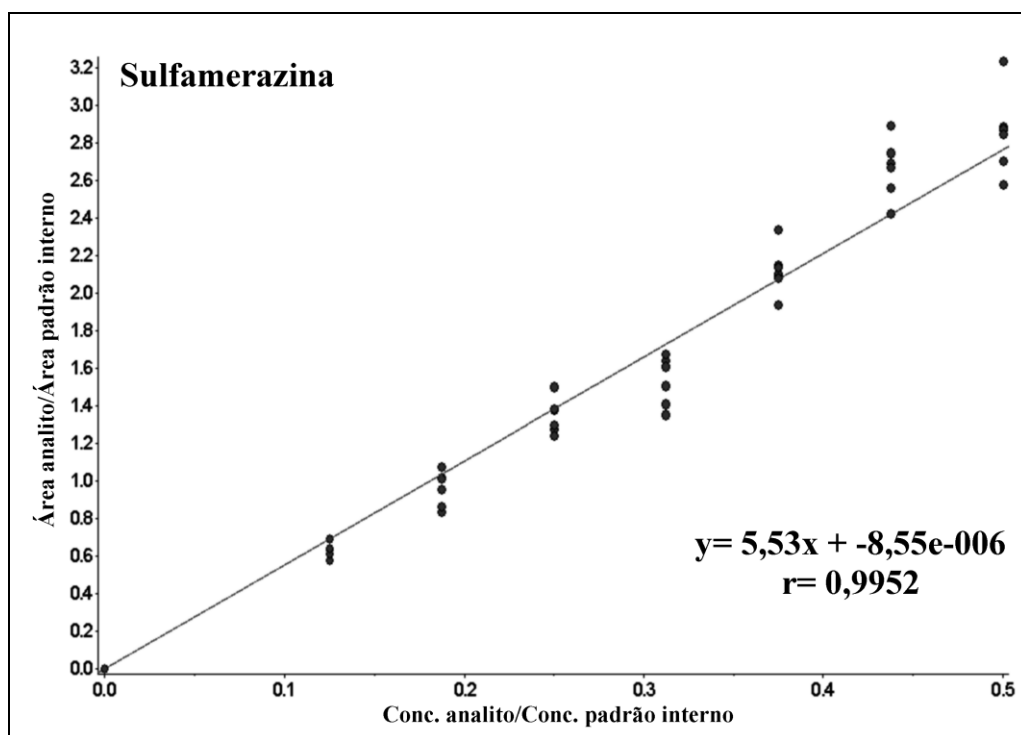


FIGURA 41 – CURVA ANALÍTICA DA SULFAMERAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 45 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMERAZINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfamerazina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	22,69	1,41	6,20	-9,24
	37,5	34,67	3,41	9,83	-7,54
	50,0	48,62	3,45	7,11	-2,76
	62,5	55,35	4,75	8,59	-11,43
	75,0	76,76	4,71	6,14	2,35
	87,5	96,28	5,80	6,03	10,04
	100,0	103,12	8,02	7,78	3,12

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 46 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMERAZINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	35,50081	1	35,50081	80,86652	$2,55 \times 10^{-14}$	3,942303
Dentro dos grupos	41,26647	94	0,439005			
Total	76,76728	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

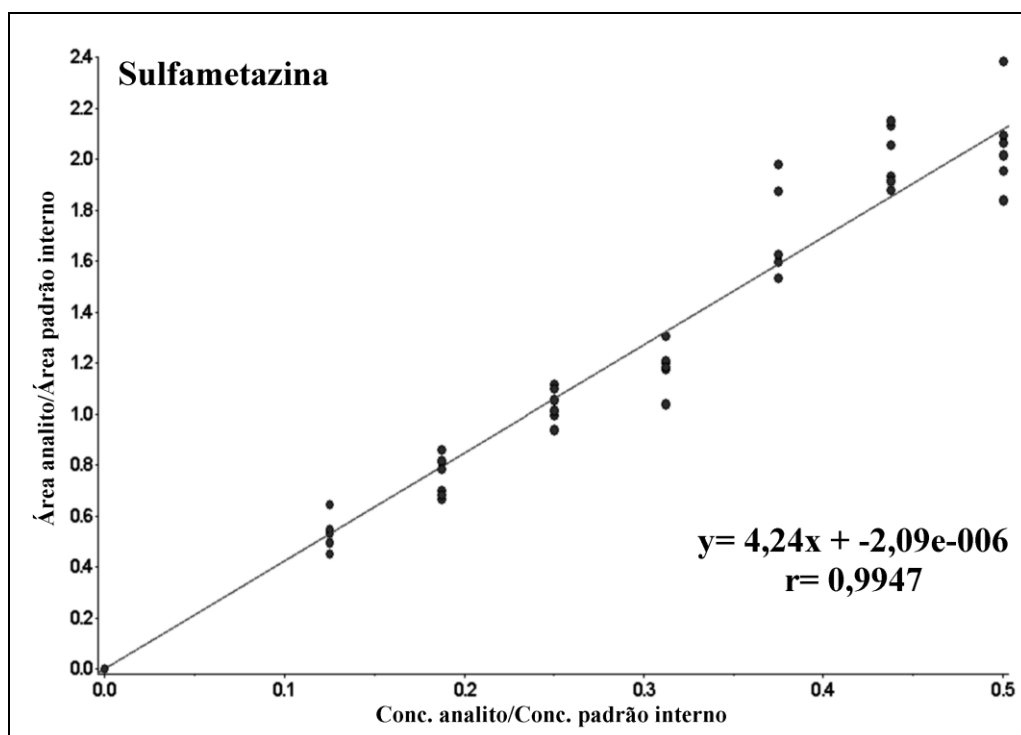


FIGURA 42 – CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 47 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETAZINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfametazina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	25,29	3,06	12,11	1,14
	37,5	35,46	3,73	10,52	-5,45
	50,0	48,88	3,19	6,53	-2,24
	62,5	55,95	4,07	7,28	-10,48
	75,0	79,80	8,98	11,25	6,40
	87,5	94,93	5,51	5,80	8,49
	100,0	97,20	8,66	8,91	-2,80

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 48 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMETAZINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	17,98267	1	17,98267	74,00234	$1,71 \times 10^{-13}$	3,942303
Dentro dos grupos	22,84213	94	0,243001			
Total	40,8248	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

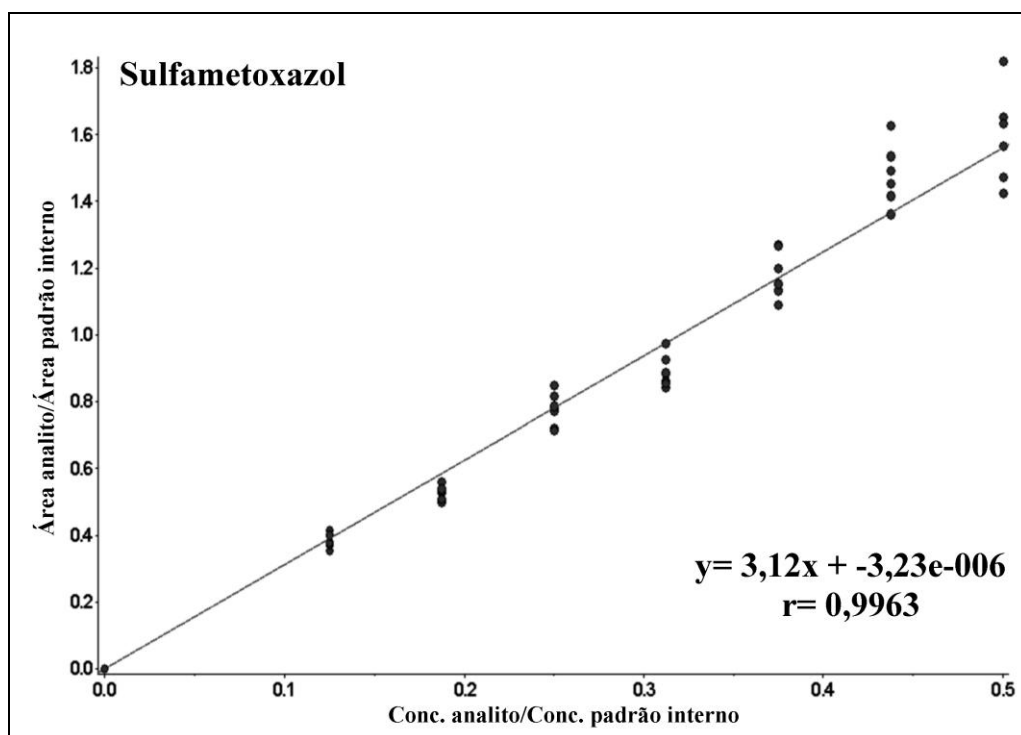


FIGURA 43 – CURVA ANALÍTICA DO SULFAMETOXAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 49 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO SULFAMETOXAZOL

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfametoxazol	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	24,43	1,39	5,68	-2,26
	37,5	33,72	1,40	4,14	-10,08
	50,0	49,66	3,39	6,82	-0,68
	62,5	56,98	3,24	5,68	-8,83
	75,0	75,85	4,70	6,20	1,14
	87,5	94,78	5,96	6,29	8,33
	100,0	102,07	9,06	8,87	2,07

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 50 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO SULFAMETOXAZOL

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	7,959634	1	7,959634	54,90367	$5,42 \times 10^{-11}$	3,942303
Dentro dos grupos	13,62761	94	0,144975			
Total	21,58724	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

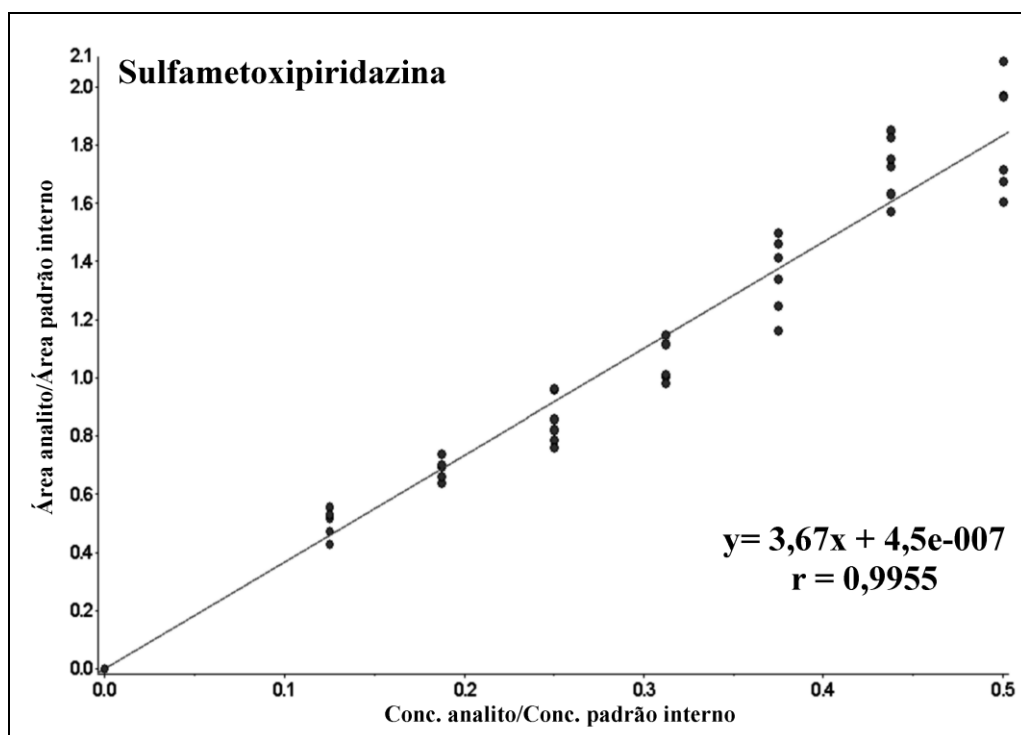


FIGURA 44 – CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 51 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	27,03	2,52	9,31	8,13
	37,5	37,89	2,20	5,80	1,04
Sulfametoxipiridazina	50,0	46,70	4,70	10,07	-6,59
	62,5	57,91	3,89	6,71	-7,35
	75,0	73,75	7,05	9,56	-1,67
	87,5	94,13	5,90	6,27	7,57
	100,0	100,09	10,69	10,68	0,09

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 52 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAMETOXIPIRIDAZINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	0,861196	1	0,861196	15,28877	0,000174	3,942303
Dentro dos grupos	5,294891	94	0,056329			
Total	6,156087	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

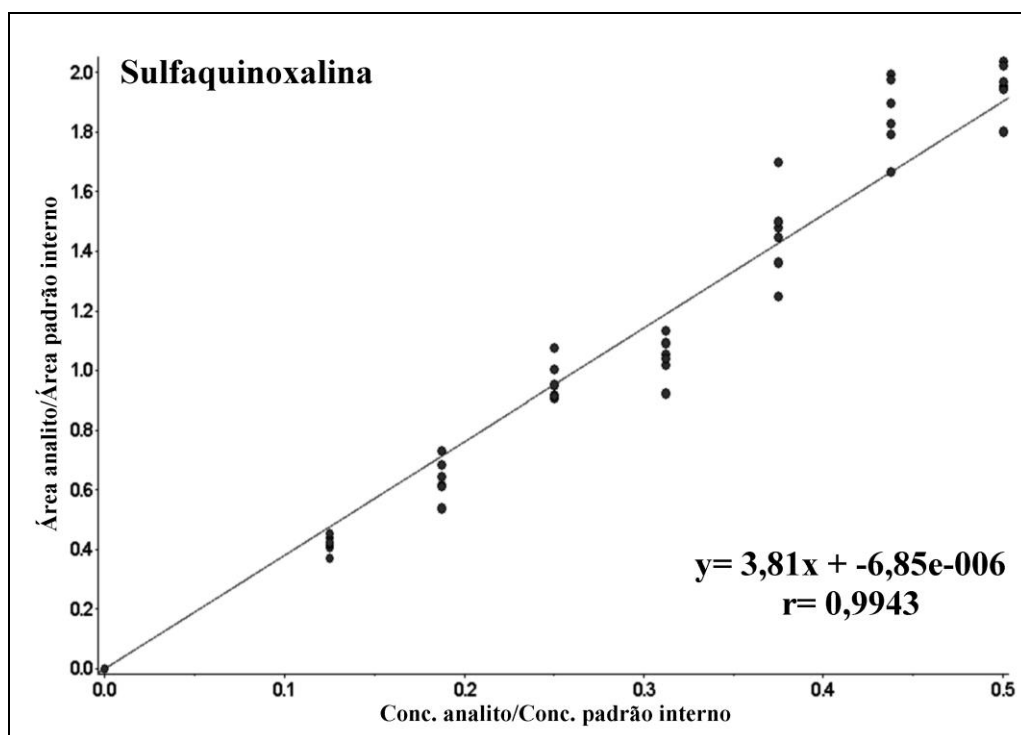


FIGURA 45 – CURVA ANALÍTICA DA SULFAQUINOXALINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 53 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFAQUINOXALINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfaquinoxalina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	21,96	1,49	6,78	-12,16
	37,5	33,49	3,47	10,36	-10,69
	50,0	50,52	3,52	6,97	1,03
	62,5	54,78	3,77	6,88	-12,35
	75,0	76,47	7,90	10,33	1,96
	87,5	97,61	6,46	6,61	11,55
	100,0	102,67	4,42	4,30	2,67

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 54 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA SULFAQUINOXALINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	13,87813	1	13,87813	63,19062	$4,08 \times 10^{-12}$	3,942303
Dentro dos grupos	20,64458	94	0,219623			
Total	34,52271	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

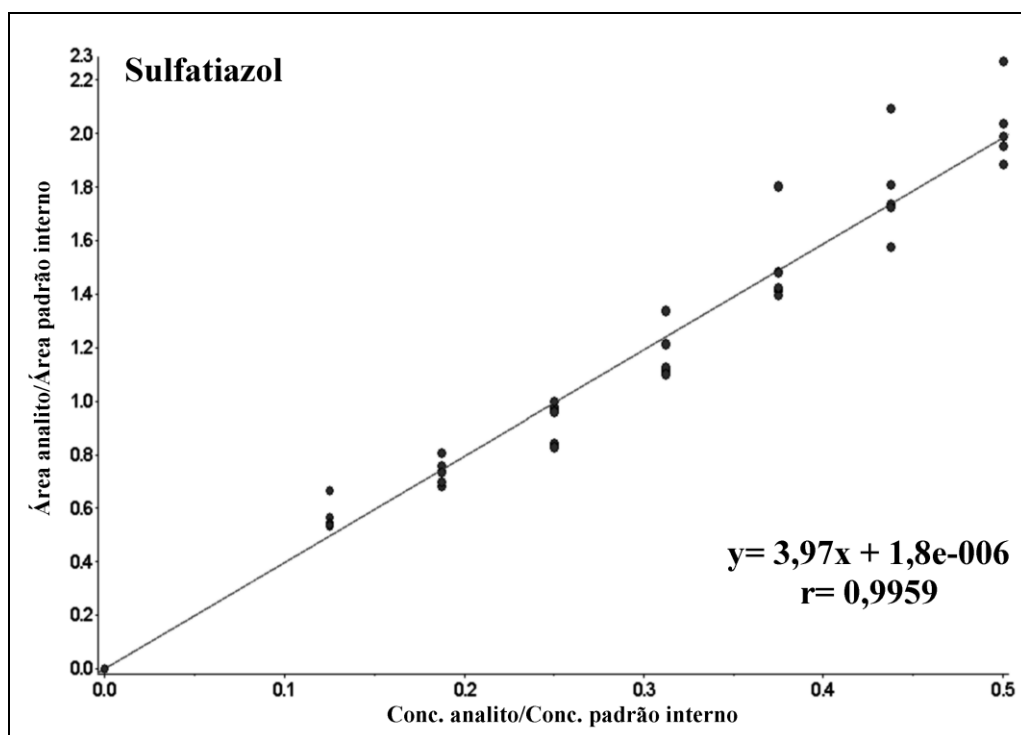


FIGURA 46 – CURVA ANALÍTICA DA SULFATIAZOL, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 55 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA SULFATIAZOL

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Sulfatiazol	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	28,45	2,55	8,98	13,79
	37,5	37,03	2,24	6,05	-1,26
	50,0	46,80	3,74	7,99	-6,39
	62,5	58,70	4,72	8,05	-6,08
	75,0	75,52	7,69	10,18	0,69
	87,5	89,51	8,64	9,66	2,29
	100,0	101,50	6,76	6,66	1,50

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 56 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO SULFATIAZOL

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	6,195048	1	6,195048	47,03674	$7,29 \times 10^{-10}$	3,942303
Dentro dos grupos	12,38042	94	0,131707			
Total	18,57547	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

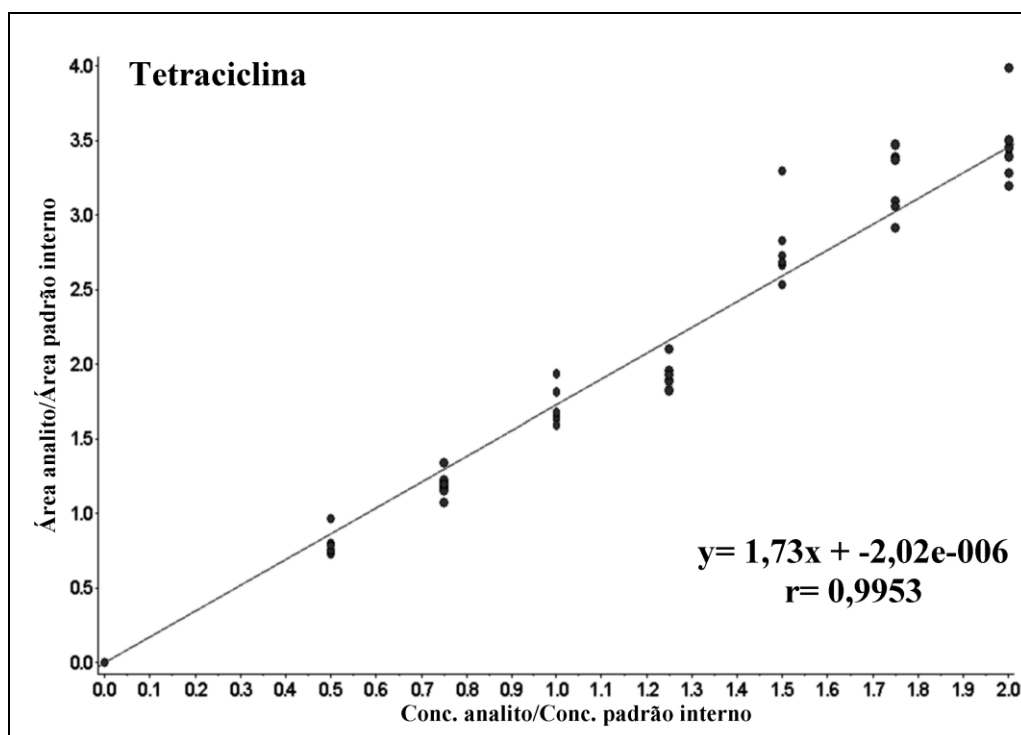


FIGURA 47 – CURVA ANALÍTICA DA TETRACICLINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 57 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TETRACICLINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Tetraciclina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	100	93,11	9,59	10,30	-6,89
	150	138,09	10,07	7,29	-7,94
	200	199,04	15,00	7,54	-0,48
	250	223,53	10,89	4,87	-10,59
	300	322,63	30,98	9,60	7,54
	350	372,24	25,80	6,93	6,35
	400	401,34	32,12	8,00	0,34

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 58 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TETRACICLINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	19,5565	1	19,5565	20,99149	1,42 x 10 <sup>-5</sup>	3,942303
Dentro dos grupos	87,57412	94	0,93164			
Total	107,1306	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

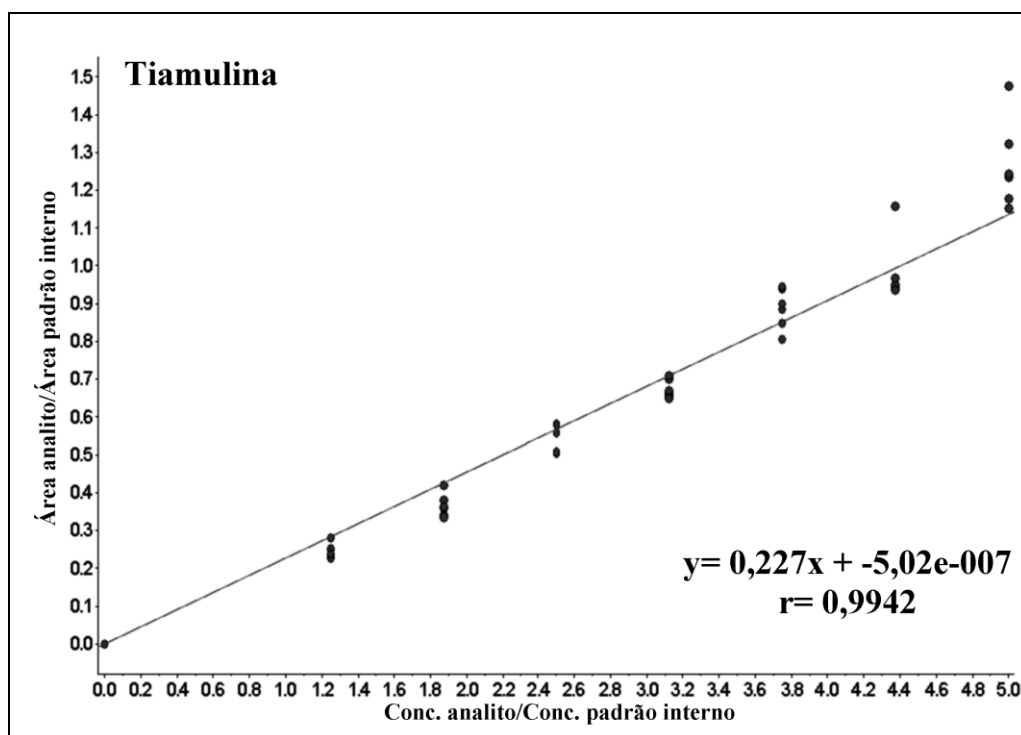


FIGURA 48 – CURVA ANALÍTICA DA TIAMULINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 59 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TIAMULINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Tiamulina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	500	429,68	34,62	8,06	-14,06
	750	644,42	52,85	8,20	-14,08
	1000	964,77	60,00	6,22	-3,52
	1250	1187,01	43,04	3,63	-5,04
	1500	1561,74	93,97	6,02	4,12
	1750	1730,63	151,49	8,75	-1,11
	2000	2231,74	206,98	9,27	11,59

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 60 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TIAMULINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	106,5871	1	106,5871	80,22177	$3,04 \times 10^{-14}$	3,942303
Dentro dos grupos	124,8936	94	1,328655			
Total	231,4807	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

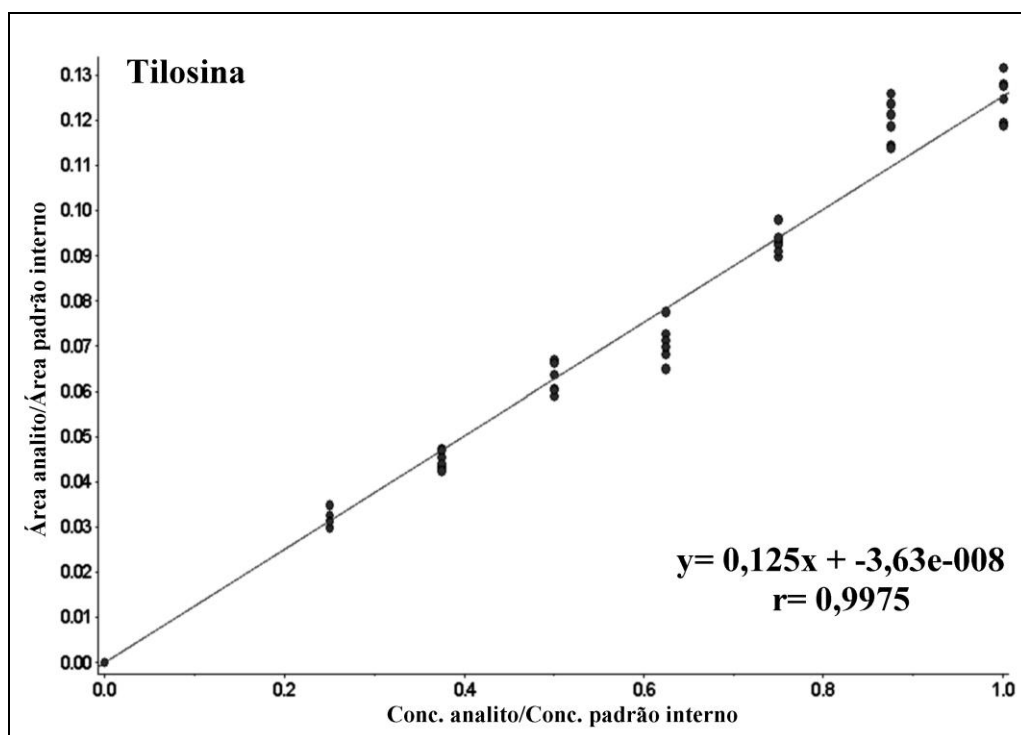


FIGURA 49 – CURVA ANALÍTICA DA TILOSINA, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 61 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DA TILOSINA

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Tilosina	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	100	103,49	6,53	6,31	3,49
	150	143,21	6,48	4,53	-4,53
	200	200,39	10,66	5,32	0,20
	250	225,82	13,57	6,01	-9,67
	300	296,70	9,20	3,10	-1,10
	350	381,54	15,49	4,06	9,01
	400	398,85	16,17	4,05	-0,29

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 62 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DA TILOSINA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	5,410919	1	5,410919	106,9267	$3,48 \times 10^{-17}$	3,942303
Dentro dos grupos	4,756776	94	0,050604			
Total	10,16769	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

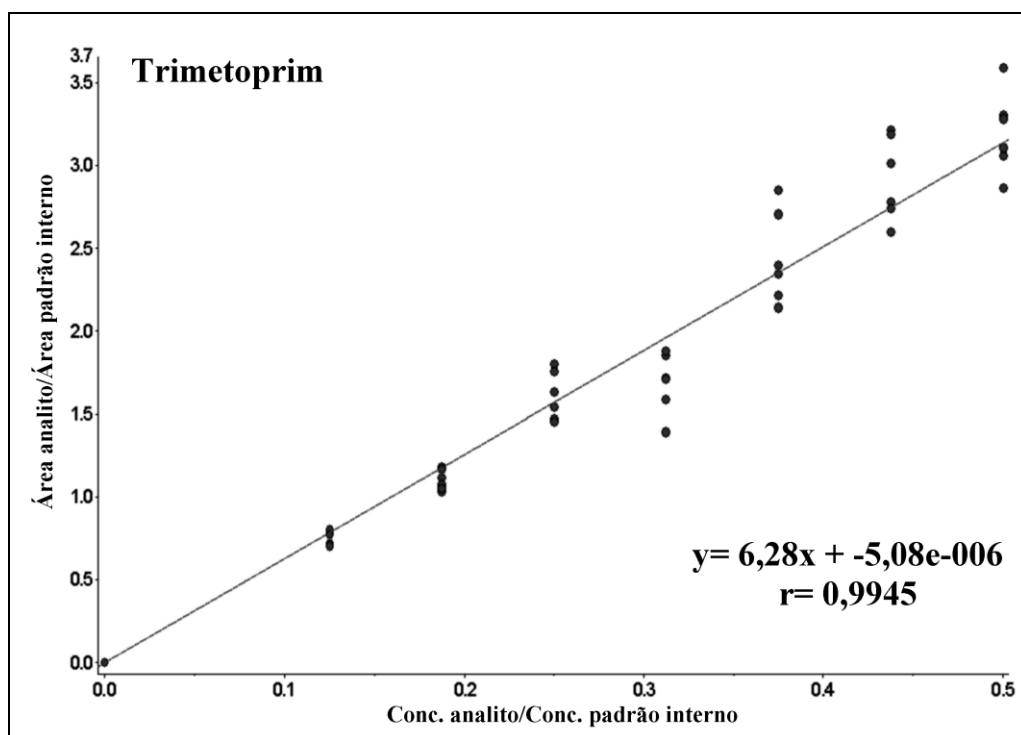


FIGURA 50 – CURVA ANALÍTICA DO TRIMETOPRIM, EQUAÇÃO DA RETA E COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DE REGRESSÃO LINEAR 1/X

TABELA 63 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS EM CADA NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA ANALÍTICA DO TRIMETOPRIM

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Conc. média determinada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Desvio padrão	Precisão (CV%) <sup>a</sup>	Exatidão (ER%) <sup>b</sup>
Trimetoprim	0	< LD	N/A	N/A	N/A
	25,0	24,35	1,33	5,46	-2,61
	37,5	35,13	1,95	5,55	-6,33
	50,0	51,27	4,64	9,05	2,54
	62,5	53,83	5,76	10,70	-13,87
	75,0	77,83	8,86	11,39	3,77
	87,5	93,12	8,10	8,70	6,43
	100,0	101,98	7,95	7,79	1,98

Dados: <sup>a</sup>Coefficiente de variação; <sup>b</sup>Erro relativo; n=6; LD: limite de detecção; N/A: não aplicável

TABELA 64 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ENTRE ÁREA E CONCENTRAÇÃO DO TRIMETOPRIM

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F observado	p	F crítico
Entre grupos	65,64051	1	65,64051	96,16499	$4,74 \times 10^{-16}$	3,942303
Dentro dos grupos	64,16272	94	0,682582			
Total	129,8032	95				

NOTA: SQ: soma de quadrados; gl: grau de liberdade; MQ: quadrado médio; F: teste de variâncias; p: probabilidade para a hipótese de nulidade; F crítico para nível de 5% de probabilidade.

### 4.3.4 Efeito residual

Nenhum pico interferente foi observado no mesmo tempo de retenção dos analitos e padrões internos, conforme demonstrado nos cromatogramas obtidos com as injeções alternadas de amostra de ovo fortificada no nível mais alto de concentração (4 MNV e 2 LMR) e amostra de ovo isenta dos analitos de interesse (Figura 51).

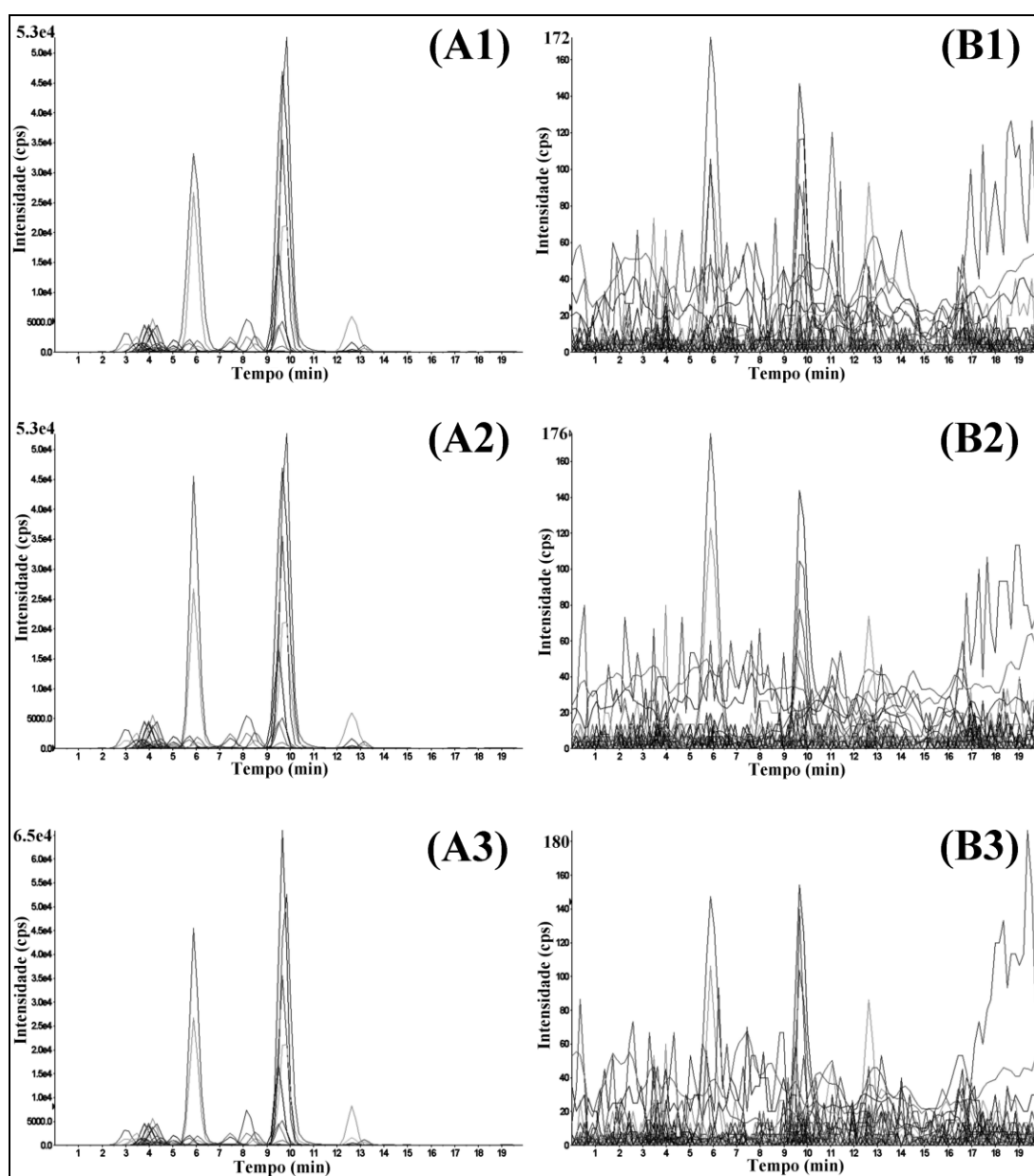


FIGURA 51 – CROMATOGRAMAS OBTIDOS POR LC-MS/MS ATRAVÉS DE INJEÇÕES ALTERNADAS DE AMOSTRAS PREPARADAS NO NÍVEL MAIS ALTO DE CONCENTRAÇÃO (A1, A2, A3) E AMOSTRAS DE OVO ISENTAS DOS ANALITOS DE INTERESSE (B1, B2, B3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.5 Efeito matriz

As variações obtidas entre os fatores de matriz normalizados (FMN) de cada analito foram inferiores a 15% (Tabela 65) para as amostras de ovo procedentes da fonte A e B, indicando que os efeitos da matriz biológica na resposta dos analitos foram insignificantes.

TABELA 65 – VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DOS ANALITOS EM ESTUDO CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ (n=6) (Continua)

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Amostra de ovo (A)			Amostra de ovo (B)		
		FMN	Média $\pm$ DP	FMN (DPR%)	FMN	Média $\pm$ DP	FMN (DPR%)
CTC	100	0,93	1,03 $\pm$ 0,15	14,11	0,95	0,94 $\pm$ 0,01	1,53
	400	1,13			0,93		
DXC	25	1,10	1,03 $\pm$ 0,10	9,46	0,87	0,96 $\pm$ 0,13	13,53
	100	0,96			1,05		
ERY	75	1,11	1,21 $\pm$ 0,14	11,86	1,04	1,12 $\pm$ 0,11	10,15
	300	1,31			1,20		
FLU	200	0,44	0,48 $\pm$ 0,06	12,06	0,57	0,54 $\pm$ 0,03	5,47
	800	0,52			0,52		
LAS	75	1,09	1,21 $\pm$ 0,17	13,87	1,34	1,30 $\pm$ 0,06	4,98
	300	1,33			1,25		
LIN	25	0,79	0,88 $\pm$ 0,13	14,45	0,93	1,00 $\pm$ 0,10	10,13
	100	0,97			1,07		
NAR	1	1,37	1,29 $\pm$ 0,11	8,45	9,24	8,56 $\pm$ 0,96	11,23
	4	1,21			7,88		
OTC	100	1,00	1,04 $\pm$ 0,05	4,97	0,83	0,91 $\pm$ 0,11	12,35
	400	1,08			0,99		
SCT	25	0,58	0,60 $\pm$ 0,03	5,36	0,61	0,63 $\pm$ 0,02	2,71
	100	0,62			0,64		
SCP	25	0,73	0,78 $\pm$ 0,08	9,93	0,91	0,93 $\pm$ 0,02	2,55
	100	0,84			0,95		
SDZ	25	0,90	0,96 $\pm$ 0,08	8,69	1,08	1,11 $\pm$ 0,05	4,10
	100	1,02			1,14		
SDMX	25	0,89	0,86 $\pm$ 0,04	5,06	0,78	0,80 $\pm$ 0,03	3,83
	100	0,83			0,82		
SMR	25	0,86	0,87 $\pm$ 0,01	1,46	1,02	0,98 $\pm$ 0,05	5,18
	100	0,88			0,94		
SMZ	25	1,11	1,08 $\pm$ 0,05	4,56	1,12	1,06 $\pm$ 0,08	9,42
	100	1,04			1,00		
SMX	25	0,74	0,78 $\pm$ 0,07	8,35	0,86	0,88 $\pm$ 0,02	2,49
	100	0,83			0,89		
SMPZ	25	0,73	0,80 $\pm$ 0,09	11,47	0,57	0,60 $\pm$ 0,05	7,53
	100	0,86			0,63		
SQ	25	0,83	0,81 $\pm$ 0,03	3,93	0,73	0,76 $\pm$ 0,03	4,62
	100	0,79			0,78		

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 65 – VARIAÇÃO DO FATOR DE MATRIZ NORMALIZADO (FMN) DOS ANALITOS EM ESTUDO CALCULADO PARA AVALIAR O EFEITO MATRIZ (n=6) (Conclusão)

Analito	Concentração nominal ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Amostra de ovo (A)			Amostra de ovo (B)		
		FMN	Média $\pm$ DP	FMN (DPR%)	FMN	Média $\pm$ DP	FMN (DPR%)
STZ	25	0,63	0,70 $\pm$ 0,10	13,76	0,82	0,89 $\pm$ 0,09	10,30
	100	0,77			0,95		
TC	100	0,94	1,04 $\pm$ 0,15	14,07	0,93	0,97 $\pm$ 0,06	6,22
	400	1,14			1,02		
TIA	500	0,36	0,37 $\pm$ 0,02	5,71	0,66	0,64 $\pm$ 0,03	4,33
	2000	0,39			0,62		
TMP	25	0,83	0,86 $\pm$ 0,04	4,91	0,73	0,75 $\pm$ 0,03	3,98
	100	0,89			0,77		
TYL	100	0,75	0,72 $\pm$ 0,04	5,26	1,18	1,31 $\pm$ 0,19	14,43
	400	0,69			1,44		

Dados: DXC: doxiciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TMP: trimetoprim; ERY: eritromicina; LAS: lasalocid; FLU: flubendazol; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; CTC: clortetraciclina; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina e TYL: tilosina.

### 4.3.6 Recuperação (Eficiência da extração)

Os valores de recuperação dos analitos e padrões internos são apresentados na Tabela 66. Conforme demonstrado, para todos os compostos uma recuperação satisfatória (49,0 a 103,7%) foi obtida com alta reprodutibilidade (CV<8%).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 66 – EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÕES INTERNOS OBTIDA ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA (continua)

ROSETONITRILIA (continua)						
Analito	Concentração (µg kg <sup>-1</sup> )	Conjunto A		Conjunto B		Recuperação Média (n=6) (%)
		Fortificado antes		Fortificado depois		
		Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	
Clortetraciclina	100	10733 ± 351,2	3,3	14660 ± 550,4	3,7	73,2
	200	21583 ± 1081,5	5,0	28133 ± 1155,3	4,1	76,7
	300	33640 ± 1055,0	3,1	48167 ± 2112,7	4,4	69,8
Doxiciclina	25	12833 ± 208,2	1,6	20740 ± 472,2	2,3	61,9
	50	24267 ± 862,2	3,5	37875 ± 1596,6	4,2	64,1
	75	41000 ± 1510,0	3,7	67050 ± 2981,1	4,4	61,1
Eritromicina	75	134333 ± 4163,3	3,1	142000 ± 2828,4	2,0	94,6
	150	273250 ± 8539,1	3,1	293000 ± 4358,9	1,5	93,3
	225	454000 ± 5656,9	1,2	460000 ± 18385,0	4,0	98,7
Flubendazol	200	466500 ± 21920,3	4,7	590000 ± 7071,1	1,2	79,1
	400	884667 ± 20392,8	2,3	1096667 ± 55075,7	5,0	80,7
	600	1417500 ± 70887,2	5,0	1686667 ± 83266,6	4,9	84,0
Lasalocid	75	28575 ± 590,9	2,1	58033 ± 2454,2	4,2	49,2
	150	67467 ± 1833,9	2,7	137750 ± 5500,0	4,0	49,0
	225	101667 ± 2516,6	2,5	203500 ± 6364,0	3,1	50,0
Lincomicina	25	13800 ± 692,8	5,0	17067 ± 568,6	3,3	80,9
	50	28100 ± 941,6	3,3	32850 ± 1511,1	4,6	85,5
	75	45075 ± 1554,3	3,4	54267 ± 1662,3	3,1	83,1
Narasina	1	2240 ± 56,6	2,5	2270 ± 85,4	3,8	98,7
	2	5980 ± 297,0	5,0	6230 ± 216,6	3,5	96,0
	3	6705 ± 247,5	3,7	6850 ± 297,0	4,3	97,9
Oxitetraciclina	100	15000 ± 360,6	2,4	17400 ± 707,1	4,1	86,2
	200	29150 ± 495,0	1,7	30850 ± 1202,1	3,9	94,5
	300	34500 ± 2451,5	7,1	37500 ± 1414,2	3,8	92,0

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 66 – EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÕES INTERNOS OBTIDA ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA (continuação)

ACEFOLUR FIA (continuação)						
Analito	Concentração (µg kg <sup>-1</sup> )	Conjunto A		Conjunto B		Recuperação Média (n=6) (%)
		Fortificado antes		Fortificado depois		
		Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	
Sulfacetamida	25	30300 ± 1410,7	4,7	32367 ± 1214,4	3,7	93,6
	50	59520 ± 2037,6	3,4	63550 ± 3085,9	4,9	93,7
	75	83183 ± 4063,2	4,9	95467 ± 3083,9	3,2	87,1
Sulfaclopiridazina	25	18150 ± 495,0	2,7	22233 ± 1001,7	4,5	81,6
	50	44400 ± 1500,0	3,4	51675 ± 2424,0	4,7	85,9
	75	68500 ± 282,8	0,4	78200 ± 707,1	0,9	87,6
Sulfadiazina	25	24200 ± 565,7	2,3	24700 ± 843,5	3,4	98,0
	50	44450 ± 1454,9	3,3	46667 ± 1357,7	2,9	95,2
	75	108667 ± 3055,1	2,8	117000 ± 4242,6	3,6	92,9
Sulfadimetoxina	25	47800 ± 2080,1	4,3	51733 ± 2195,1	4,2	92,4
	50	91825 ± 3617,0	3,9	102633 ± 3677,9	3,6	89,5
	75	142600 ± 5770,6	4,0	161333 ± 3266,0	2,0	88,4
Sulfamerazina	25	30100 ± 1131,4	3,8	33000 ± 141,4	0,4	91,2
	50	63025 ± 2921,6	4,6	67850 ± 777,8	1,1	92,9
	75	100150 ± 2616,3	2,6	104000 ± 2828,4	2,7	96,3
Sulfametazina	25	34720 ± 1652,9	4,8	35333 ± 1738,8	4,9	98,3
	50	64640 ± 2708,0	4,2	64975 ± 1913,8	2,9	99,5
	75	98400 ± 4293,0	4,4	94880 ± 3004,5	3,2	103,7
Sulfametoxazol	25	17967 ± 873,7	4,9	18500 ± 871,8	4,7	97,1
	50	34700 ± 1276,7	3,7	37467 ± 1446,8	3,9	92,6
	75	51867 ± 1900,9	3,7	51500 ± 1770,1	3,4	100,7
Sulfametoxipiridazina	25	18167 ± 665,8	3,7	21150 ± 495,0	2,3	85,9
	50	30950 ± 1202,1	3,9	33000 ± 1044,0	3,2	93,8
	75	91450 ± 212,1	0,2	101100 ± 4101,2	4,1	90,4



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 66 – EFICIÊNCIA DA EXTRAÇÃO DOS ANALITOS E PADRÕES INTERNOS OBTIDA ATRAVÉS DE PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ACETONITRILA (conclusão)

ACEPTONITRIL (conclusão)						
Analito	Concentração (µg kg <sup>-1</sup> )	Conjunto A		Conjunto B		Recuperação Média (n=6) (%)
		Fortificada antes		Fortificada depois		
		Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	Área (média ± DP)	Precisão (CV%)	
Sulfaquinoxalina	25	19333 ± 950,4	4,9	22267 ± 1001,3	4,5	86,8
	50	38683 ± 1938,5	5,0	42817 ± 767,9	1,8	90,3
	75	58980 ± 2771,6	4,7	70483 ± 1548,4	2,2	83,7
Sulfatiazol	25	17950 ± 777,8	4,3	18150 ± 777,8	4,3	98,9
	50	42650 ± 636,4	1,5	45750 ± 1060,7	2,3	93,2
	75	116000 ± 2828,4	2,4	119500 ± 707,1	0,6	97,1
Tetraciclina	100	25800 ± 565,7	2,2	36933 ± 1647,6	4,5	69,9
	200	59150 ± 732,6	1,2	79767 ± 2532,7	3,2	74,1
	300	96750 ± 919,2	0,9	136667 ± 3214,6	2,3	70,8
Tiamulina	500	1790000 ± 70710,7	3,9	1960000 ± 14142,1	0,7	91,3
	1000	1985000 ± 49497,5	2,5	2133333 ± 77674,5	3,6	93,0
	1500	2580000 ± 127279,0	4,9	3006666 ± 146401,3	4,9	85,8
Tilosina	100	77450 ± 1767,8	2,3	85433 ± 1361,4	1,6	90,7
	200	166500 ± 7852,8	4,7	193333 ± 6658,3	3,4	86,1
	300	254000 ± 12166,0	4,8	292000 ± 10424,0	3,6	87,0
Trimetoprim	25	28300 ± 871,8	3,1	28400 ± 424,3	1,5	99,6
	50	59700 ± 282,8	0,5	62400 ± 2023,2	3,2	95,7
	75	157333 ± 9237,6	5,9	163000 ± 7071,1	4,3	96,5
Cambendazol (PI)	400	1213571 ± 57460,0	4,7	1417000 ± 65328,2	4,6	85,6
Demeclociclina (PI)	200	41264 ± 1533,8	3,7	62270 ± 2646,6	4,2	66,3
Nigericina (PI)	150	25729 ± 1264,5	4,9	35175 ± 1532,3	4,4	73,1
Sulfamerazina deuterada (PI)	200	18040 ± 888,4	4,9	19400 ± 879,4	4,5	93,0

Nota: PI: padrão interno

### 4.3.7 Precisão e exatidão

#### 4.3.7.1 Repetibilidade

A repetibilidade foi realizada por um mesmo analista, em sextuplicata, contemplando três níveis de concentração (1, 2 e 3 MNV para substâncias proibidas e 0,5, 1 e 1,5 LMR para as permitidas) e em três dias consecutivos.

Conforme descrito na Tabela 67, foram observadas variações menores do que 10% para todos os analitos dentre as réplicas dos diferentes níveis de concentração avaliados. Os valores de precisão variaram entre 0,9 a 9,7% (CV), enquanto os valores de exatidão variaram entre -6,8 a 6,4% (ER, bias), e 93,2 a 106,4% (recuperação), estando de acordo com a exigência da Diretiva 2002/657/CE (CCE, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 67 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE (continua)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
CTC	100	98,8 $\pm$ 4,7	95,8 $\pm$ 3,2	102,7 $\pm$ 5,2	99,1 $\pm$ 3,4	3,5	-0,9	99,1
	200	205,1 $\pm$ 8,7	195,6 $\pm$ 7,6	195,6 $\pm$ 10,3	198,8 $\pm$ 5,5	2,8	-0,6	98,4
	300	300,4 $\pm$ 18,7	304,2 $\pm$ 9,6	298,0 $\pm$ 13,7	300,9 $\pm$ 3,1	1,0	0,3	100,3
DXC	25	25,2 $\pm$ 0,9	23,0 $\pm$ 1,9	24,0 $\pm$ 1,9	24,1 $\pm$ 1,1	4,4	-3,6	96,4
	50	51,7 $\pm$ 1,9	46,1 $\pm$ 1,3	49,1 $\pm$ 2,8	49,0 $\pm$ 2,8	5,7	-2,0	97,9
	75	74,8 $\pm$ 6,6	73,2 $\pm$ 1,6	73,6 $\pm$ 3,3	73,9 $\pm$ 0,8	1,1	-1,5	98,5
ERY	75	69,2 $\pm$ 3,1	72,0 $\pm$ 3,5	77,6 $\pm$ 5,5	73,0 $\pm$ 4,3	5,9	-2,7	97,3
	150	158,8 $\pm$ 10,7	163,5 $\pm$ 4,5	156,7 $\pm$ 3,2	159,7 $\pm$ 3,5	2,2	6,4	106,4
	225	235,0 $\pm$ 8,4	213,3 $\pm$ 2,7	241,5 $\pm$ 3,2	230,0 $\pm$ 14,8	6,4	2,2	102,2
FLU	200	203,0 $\pm$ 8,8	180,1 $\pm$ 8,4	195,0 $\pm$ 2,5	191,1 $\pm$ 9,7	5,1	-4,4	95,6
	400	421,9 $\pm$ 21,9	385,7 $\pm$ 15,4	376,7 $\pm$ 20,6	389,4 $\pm$ 14,9	3,8	-2,6	97,4
	600	630,2 $\pm$ 22,4	613,1 $\pm$ 16,3	589,5 $\pm$ 13,4	601,3 $\pm$ 16,6	2,8	0,2	100,2
LAS	75	77,2 $\pm$ 5,3	64,2 $\pm$ 3,8	68,3 $\pm$ 3,2	69,9 $\pm$ 6,7	9,5	-6,8	93,2
	150	135,2 $\pm$ 5,9	153,3 $\pm$ 4,5	135,2 $\pm$ 2,7	141,2 $\pm$ 10,4	7,4	-5,8	94,2
	225	232,8 $\pm$ 15,8	244,8 $\pm$ 16,6	214,0 $\pm$ 8,1	230,5 $\pm$ 15,5	6,7	2,5	102,5
LIN	25	24,3 $\pm$ 1,3	23,3 $\pm$ 0,6	24,0 $\pm$ 1,7	23,9 $\pm$ 0,5	2,1	-4,4	95,5
	50	52,9 $\pm$ 2,6	48,5 $\pm$ 1,7	52,9 $\pm$ 3,4	51,4 $\pm$ 2,5	4,9	2,9	102,9
	75	77,9 $\pm$ 5,7	73,0 $\pm$ 2,1	71,1 $\pm$ 3,8	74,0 $\pm$ 3,5	4,7	-1,3	98,7
NAR	1	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	5,5	1,0	101,0
	2	2,0 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,03	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	5,0	2,7	102,7
	3	3,1 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,1	2,5	0,5	100,5
OTC	100	97,0 $\pm$ 4,1	101,2 $\pm$ 4,6	96,7 $\pm$ 6,9	98,3 $\pm$ 2,5	2,6	-1,7	98,3
	200	202,0 $\pm$ 13,0	198,5 $\pm$ 13,0	202,1 $\pm$ 14,7	200,9 $\pm$ 2,0	1,0	0,4	100,4
	300	305,4 $\pm$ 19,4	300,3 $\pm$ 12,2	293,0 $\pm$ 13,7	299,6 $\pm$ 6,2	2,1	-0,1	99,9

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 67 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE (continuação)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
SCT	25	27,4 $\pm$ 1,5	26,4 $\pm$ 1,0	23,0 $\pm$ 0,8	25,6 $\pm$ 2,3	8,9	2,4	102,4
	50	53,3 $\pm$ 3,9	46,2 $\pm$ 2,3	52,4 $\pm$ 2,1	50,6 $\pm$ 3,9	7,6	1,2	101,2
	75	77,6 $\pm$ 3,1	70,9 $\pm$ 0,8	74,4 $\pm$ 2,6	74,3 $\pm$ 3,4	4,5	-0,9	99,1
SCP	25	24,6 $\pm$ 1,2	23,5 $\pm$ 1,4	23,5 $\pm$ 1,2	23,9 $\pm$ 0,6	2,7	-4,5	95,5
	50	52,8 $\pm$ 3,3	50,1 $\pm$ 2,6	52,0 $\pm$ 2,9	51,6 $\pm$ 1,4	2,7	3,2	103,2
	75	77,8 $\pm$ 1,9	72,7 $\pm$ 1,6	75,3 $\pm$ 3,9	75,3 $\pm$ 2,5	3,4	0,4	100,4
SDZ	25	24,1 $\pm$ 0,9	26,3 $\pm$ 1,0	22,8 $\pm$ 0,9	24,4 $\pm$ 1,8	7,3	-2,4	97,6
	50	52,3 $\pm$ 2,4	48,8 $\pm$ 1,7	52,1 $\pm$ 2,6	51,0 $\pm$ 2,0	3,9	2,1	102,1
	75	74,6 $\pm$ 3,8	73,7 $\pm$ 4,4	75,9 $\pm$ 3,3	74,7 $\pm$ 1,1	1,4	-0,3	99,7
SDMX	25	25,7 $\pm$ 1,3	23,6 $\pm$ 0,5	25,8 $\pm$ 1,1	25,0 $\pm$ 1,3	5,0	0,1	100,1
	50	50,6 $\pm$ 2,0	50,8 $\pm$ 3,4	48,5 $\pm$ 1,4	50,0 $\pm$ 1,3	2,6	-0,1	99,9
	75	77,3 $\pm$ 2,4	78,4 $\pm$ 3,4	74,3 $\pm$ 2,9	76,7 $\pm$ 2,1	2,8	2,2	102,2
SMR	25	25,3 $\pm$ 1,5	24,2 $\pm$ 1,5	24,6 $\pm$ 0,6	24,7 $\pm$ 0,5	2,2	-1,2	98,8
	50	44,2 $\pm$ 1,7	48,2 $\pm$ 0,9	50,9 $\pm$ 2,3	47,8 $\pm$ 3,4	7,1	-4,4	95,6
	75	74,7 $\pm$ 4,6	75,2 $\pm$ 4,4	72,8 $\pm$ 2,2	74,2 $\pm$ 1,2	1,7	-1,0	99,0
SMZ	25	24,8 $\pm$ 1,7	23,8 $\pm$ 1,5	25,1 $\pm$ 1,5	24,6 $\pm$ 0,7	2,7	-1,7	98,3
	50	49,0 $\pm$ 3,5	50,7 $\pm$ 3,9	50,0 $\pm$ 1,4	49,9 $\pm$ 0,8	1,6	-0,2	99,8
	75	77,9 $\pm$ 4,6	74,6 $\pm$ 1,8	75,0 $\pm$ 5,2	75,8 $\pm$ 1,8	2,4	1,1	101,1
SMX	25	24,4 $\pm$ 1,6	23,7 $\pm$ 1,0	23,2 $\pm$ 1,6	23,8 $\pm$ 0,6	2,6	-4,8	95,1
	50	53,3 $\pm$ 2,2	49,9 $\pm$ 3,8	50,9 $\pm$ 2,9	51,4 $\pm$ 1,8	3,4	2,7	102,7
	75	77,7 $\pm$ 4,0	72,5 $\pm$ 5,2	72,1 $\pm$ 4,3	74,1 $\pm$ 3,1	4,2	-1,2	98,8
SMPZ	25	25,5 $\pm$ 1,2	27,6 $\pm$ 0,7	22,7 $\pm$ 1,3	25,3 $\pm$ 2,5	9,7	1,1	101,1
	50	54,8 $\pm$ 2,8	48,1 $\pm$ 2,7	50,2 $\pm$ 2,5	51,0 $\pm$ 3,4	6,7	2,0	102,0
	75	82,9 $\pm$ 3,6	74,2 $\pm$ 4,8	76,7 $\pm$ 4,3	77,9 $\pm$ 4,5	5,7	3,9	103,9

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 67 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE (conclusão)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
SQ	25	24,3 $\pm$ 0,7	23,9 $\pm$ 0,5	23,7 $\pm$ 1,4	23,9 $\pm$ 0,3	1,2	-4,2	95,8
	50	50,3 $\pm$ 1,5	50,8 $\pm$ 3,4	49,3 $\pm$ 2,9	50,1 $\pm$ 0,8	1,6	0,3	100,3
	75	77,5 $\pm$ 0,4	76,8 $\pm$ 2,6	73,3 $\pm$ 1,8	75,9 $\pm$ 2,2	3,0	1,2	101,2
STZ	25	23,3 $\pm$ 1,0	25,6 $\pm$ 1,3	24,4 $\pm$ 1,9	24,5 $\pm$ 1,1	4,5	-2,2	97,8
	50	52,3 $\pm$ 2,9	45,6 $\pm$ 2,6	51,3 $\pm$ 2,4	49,7 $\pm$ 3,6	7,3	-0,6	99,4
	75	74,7 $\pm$ 2,9	70,9 $\pm$ 3,7	79,4 $\pm$ 6,7	75,0 $\pm$ 4,2	5,6	0,04	100,0
TC	100	100,1 $\pm$ 5,1	95,7 $\pm$ 2,4	101,8 $\pm$ 2,4	99,2 $\pm$ 3,1	3,2	-0,8	99,2
	200	206,9 $\pm$ 7,5	195,2 $\pm$ 5,2	206,9 $\pm$ 10,0	203,0 $\pm$ 6,8	3,3	1,5	101,5
	300	308,7 $\pm$ 11,7	298,3 $\pm$ 15,1	305,1 $\pm$ 17,2	304,1 $\pm$ 5,3	1,7	1,4	101,4
TIA	500	500,0 $\pm$ 18,5	513,2 $\pm$ 15,1	489,0 $\pm$ 12,7	500,7 $\pm$ 12,1	2,4	0,1	100,1
	1000	981,2 $\pm$ 43,6	966,3 $\pm$ 49,1	982,1 $\pm$ 41,0	976,5 $\pm$ 8,9	0,9	-2,3	97,6
	1500	1511,7 $\pm$ 76,9	1615,0 $\pm$ 115,5	1451,6 $\pm$ 66,2	1526,1 $\pm$ 82,7	5,4	1,7	101,7
TMP	25	25,0 $\pm$ 1,1	23,1 $\pm$ 0,3	23,5 $\pm$ 0,4	23,9 $\pm$ 1,0	4,1	-4,4	95,6
	50	53,0 $\pm$ 3,0	46,5 $\pm$ 3,7	49,2 $\pm$ 0,9	49,6 $\pm$ 3,2	6,5	-0,9	99,1
	75	77,0 $\pm$ 4,5	72,9 $\pm$ 4,5	72,1 $\pm$ 4,6	74,0 $\pm$ 2,6	3,5	-1,4	98,6
TYL	100	97,0 $\pm$ 6,0	100,3 $\pm$ 3,8	97,3 $\pm$ 4,5	98,2 $\pm$ 1,9	1,9	-1,8	98,2
	200	197,4 $\pm$ 9,5	196,4 $\pm$ 10,6	205,8 $\pm$ 9,0	199,9 $\pm$ 5,1	2,6	-0,1	99,9
	300	303,5 $\pm$ 12,9	289,8 $\pm$ 7,1	290,4 $\pm$ 15,4	294,6 $\pm$ 7,7	2,6	-1,8	98,2

Nota: CTC: clortetraciclina; DXC: doxiciclina; ERY: eritromicina; FLU: flubendazol; LAS: lasalocid; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitettraciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina; TMP: trimetoprim; TYL: tilosina.

### 4.3.7.2 Reprodutibilidade intralaboratorial

A reprodutibilidade intralaboratorial foi realizada por outro analista, em sextuplicata, contemplando três níveis de concentração (1, 2 e 3 MNV para substâncias proibidas e 0,5, 1 e 1,5 LMR para as permitidas) e em três dias consecutivos.

Conforme descrito na Tabela 68, foram observadas variações menores do que 11% para todos os analitos dentre as réplicas dos diferentes níveis de concentração avaliados. Os valores de precisão variaram entre 0,8 a 10,6% (CV), enquanto os valores de exatidão variaram entre -9,5 a 9,0% (ER), e 90,5 a 109,0% (recuperação), estando de acordo com a exigência da Diretiva 2002/657/CE (CCE, 2002).

Em virtude dos resultados obtidos nos ensaios de repetibilidade e reprodutibilidade intralaboratorial, o método foi considerado preciso e exato.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 68 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL (continua)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
CTC	100	99,8 $\pm$ 4,2	108,5 $\pm$ 6,4	98,0 $\pm$ 4,8	102,1 $\pm$ 5,6	5,5	2,1	102,1
	200	195,9 $\pm$ 8,4	209,7 $\pm$ 13,2	197,4 $\pm$ 9,4	201,0 $\pm$ 7,6	3,8	0,5	100,5
	300	302,5 $\pm$ 14,1	308,5 $\pm$ 15,9	273,8 $\pm$ 5,8	294,9 $\pm$ 18,6	6,3	-1,7	98,3
DXC	25	22,5 $\pm$ 1,3	25,2 $\pm$ 1,6	23,6 $\pm$ 0,6	23,8 $\pm$ 1,3	5,6	-4,8	95,2
	50	50,7 $\pm$ 3,2	50,5 $\pm$ 2,7	46,6 $\pm$ 1,9	49,3 $\pm$ 2,3	4,7	-1,4	98,6
	75	77,7 $\pm$ 3,9	75,4 $\pm$ 4,9	77,4 $\pm$ 4,0	76,8 $\pm$ 1,2	1,6	2,5	102,5
ERY	75	82,7 $\pm$ 5,2	74,7 $\pm$ 5,5	73,6 $\pm$ 4,9	77,0 $\pm$ 5,0	6,4	2,7	102,7
	150	162,0 $\pm$ 9,1	164,8 $\pm$ 5,1	149,4 $\pm$ 6,9	158,7 $\pm$ 8,2	5,2	5,8	105,8
	225	232,3 $\pm$ 12,2	227,9 $\pm$ 14,3	215,9 $\pm$ 11,6	225,4 $\pm$ 8,5	3,8	0,2	100,2
FLU	200	190,5 $\pm$ 5,4	198,2 $\pm$ 9,0	185,0 $\pm$ 4,8	191,2 $\pm$ 6,6	3,5	-4,4	95,6
	400	397,4 $\pm$ 23,4	406,7 $\pm$ 15,7	402,3 $\pm$ 17,5	402,1 $\pm$ 4,6	1,2	0,5	100,5
	600	601,0 $\pm$ 42,4	642,5 $\pm$ 24,5	649,2 $\pm$ 50,0	630,9 $\pm$ 26,1	4,1	5,1	105,1
LAS	75	64,1 $\pm$ 1,4	73,6 $\pm$ 2,8	65,8 $\pm$ 1,9	67,9 $\pm$ 5,1	7,5	-9,5	90,5
	150	144,5 $\pm$ 4,3	134,9 $\pm$ 9,0	138,6 $\pm$ 3,3	139,3 $\pm$ 4,9	3,5	-7,1	92,9
	225	243,4 $\pm$ 14,1	225,6 $\pm$ 7,8	241,2 $\pm$ 17,7	236,7 $\pm$ 9,7	4,1	5,2	105,2
LIN	25	24,0 $\pm$ 1,1	24,3 $\pm$ 1,5	24,0 $\pm$ 1,5	24,1 $\pm$ 0,2	0,8	-3,6	96,4
	50	50,9 $\pm$ 3,4	53,1 $\pm$ 2,2	47,3 $\pm$ 2,4	50,4 $\pm$ 2,9	5,8	0,8	100,8
	75	82,5 $\pm$ 4,6	76,1 $\pm$ 4,1	74,5 $\pm$ 4,1	77,7 $\pm$ 4,2	5,4	3,6	103,6
NAR	1	0,9 $\pm$ 0,05	0,8 $\pm$ 0,03	1,0 $\pm$ 0,06	0,9 $\pm$ 0,06	6,5	-9,1	90,9
	2	2,1 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,05	2,0 $\pm$ 0,1	4,0	2,6	102,6
	3	3,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,06	1,9	-1,5	98,5
OTC	100	97,0 $\pm$ 5,1	101,1 $\pm$ 4,3	105,9 $\pm$ 5,5	101,3 $\pm$ 4,4	4,4	1,3	101,3
	200	190,1 $\pm$ 11,5	202,3 $\pm$ 9,0	194,2 $\pm$ 7,6	195,5 $\pm$ 6,2	3,1	-2,2	97,8
	300	315,1 $\pm$ 15,1	294,0 $\pm$ 16,6	310,0 $\pm$ 11,3	306,4 $\pm$ 11,0	3,6	2,1	102,1

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 68 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL (continuação)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
SCT	25	28,2 $\pm$ 0,6	25,2 $\pm$ 0,9	27,9 $\pm$ 1,8	27,1 $\pm$ 1,6	6,1	8,6	108,6
	50	56,3 $\pm$ 3,9	52,9 $\pm$ 2,7	54,2 $\pm$ 1,0	54,5 $\pm$ 1,7	3,2	9,0	109,0
	75	81,7 $\pm$ 2,4	78,6 $\pm$ 4,1	78,3 $\pm$ 3,4	79,5 $\pm$ 1,9	2,3	6,0	106,0
SCP	25	26,4 $\pm$ 1,1	26,1 $\pm$ 1,4	23,1 $\pm$ 1,2	25,2 $\pm$ 1,8	7,2	0,8	100,8
	50	49,1 $\pm$ 2,8	51,3 $\pm$ 2,5	53,9 $\pm$ 3,2	51,4 $\pm$ 2,4	4,7	2,9	102,9
	75	78,0 $\pm$ 7,3	78,7 $\pm$ 3,2	75,8 $\pm$ 3,4	77,5 $\pm$ 1,5	1,9	3,4	103,4
SDZ	25	23,9 $\pm$ 1,3	27,2 $\pm$ 1,5	24,2 $\pm$ 1,8	25,1 $\pm$ 1,8	7,2	0,4	100,4
	50	47,1 $\pm$ 1,7	56,1 $\pm$ 2,7	50,4 $\pm$ 4,8	51,2 $\pm$ 4,6	8,9	2,4	102,4
	75	82,7 $\pm$ 4,8	77,9 $\pm$ 4,5	78,4 $\pm$ 2,5	79,7 $\pm$ 2,6	3,3	6,2	106,2
SDMX	25	24,9 $\pm$ 0,6	26,5 $\pm$ 1,6	24,2 $\pm$ 1,3	25,2 $\pm$ 1,1	4,5	0,9	100,9
	50	50,4 $\pm$ 2,3	54,6 $\pm$ 2,9	52,6 $\pm$ 3,1	52,6 $\pm$ 2,1	4,0	5,1	105,1
	75	75,0 $\pm$ 4,4	80,4 $\pm$ 4,7	77,8 $\pm$ 3,8	77,7 $\pm$ 2,7	3,4	3,6	103,6
SMR	25	26,4 $\pm$ 1,7	28,2 $\pm$ 1,6	22,8 $\pm$ 1,8	25,8 $\pm$ 2,7	10,6	3,3	103,3
	50	56,5 $\pm$ 3,4	48,9 $\pm$ 4,2	53,5 $\pm$ 2,6	53,0 $\pm$ 3,8	7,3	5,9	105,9
	75	68,0 $\pm$ 3,7	77,5 $\pm$ 3,4	75,7 $\pm$ 6,1	73,7 $\pm$ 5,0	6,8	-1,6	98,3
SMZ	25	26,3 $\pm$ 1,9	25,7 $\pm$ 1,7	24,8 $\pm$ 1,0	25,6 $\pm$ 0,8	3,0	2,4	102,4
	50	53,1 $\pm$ 3,4	54,4 $\pm$ 3,3	51,1 $\pm$ 1,8	52,9 $\pm$ 1,7	3,2	5,8	105,8
	75	74,0 $\pm$ 4,0	79,0 $\pm$ 3,3	72,5 $\pm$ 2,9	75,2 $\pm$ 3,4	4,5	0,2	100,2
SMX	25	24,3 $\pm$ 1,2	24,7 $\pm$ 1,3	25,0 $\pm$ 1,3	24,7 $\pm$ 0,3	1,3	-1,3	98,7
	50	48,8 $\pm$ 3,1	49,6 $\pm$ 2,7	48,8 $\pm$ 2,9	49,1 $\pm$ 0,4	0,9	-1,8	98,1
	75	76,8 $\pm$ 4,0	79,4 $\pm$ 4,0	71,8 $\pm$ 5,5	76,0 $\pm$ 3,9	5,1	1,3	101,3
SMPZ	25	23,0 $\pm$ 1,3	28,4 $\pm$ 0,6	26,6 $\pm$ 1,4	26,0 $\pm$ 2,8	10,6	4,0	104,0
	50	47,5 $\pm$ 3,7	57,1 $\pm$ 1,7	51,6 $\pm$ 2,0	52,0 $\pm$ 4,8	9,3	4,1	104,1
	75	72,3 $\pm$ 3,1	84,2 $\pm$ 1,5	81,7 $\pm$ 5,8	79,4 $\pm$ 6,2	7,8	5,9	105,9



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 68 – VALORES DE PRECISÃO, EXATIDÃO E RECUPERAÇÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE REPRODUTIBILIDADE INTRALABORATORIAL (conclusão)

Analitos	Nível de concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Análise 1 (Média $\pm$ DP)	Análise 2 (Média $\pm$ DP)	Análise 3 (Média $\pm$ DP)	Média $\pm$ DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)	Recuperação (%)
SQ	25	22,8 $\pm$ 1,1	26,1 $\pm$ 1,4	23,9 $\pm$ 1,4	24,3 $\pm$ 1,7	7,0	-2,9	97,1
	50	49,2 $\pm$ 2,6	52,9 $\pm$ 2,8	49,1 $\pm$ 2,3	50,4 $\pm$ 2,2	4,3	0,7	100,7
	75	79,2 $\pm$ 1,5	82,6 $\pm$ 4,7	76,7 $\pm$ 3,1	79,5 $\pm$ 3,0	3,7	6,0	106,0
STZ	25	28,1 $\pm$ 0,6	23,8 $\pm$ 1,1	26,1 $\pm$ 1,7	26,0 $\pm$ 2,2	8,3	4,0	104,0
	50	44,3 $\pm$ 2,8	53,2 $\pm$ 3,2	49,2 $\pm$ 2,7	48,9 $\pm$ 4,4	9,0	-2,2	97,8
	75	80,6 $\pm$ 5,9	70,3 $\pm$ 4,6	78,1 $\pm$ 5,0	76,4 $\pm$ 5,3	7,0	1,8	101,8
TC	100	94,6 $\pm$ 2,7	98,4 $\pm$ 4,5	102,3 $\pm$ 2,6	98,5 $\pm$ 3,9	3,9	-1,5	98,5
	200	196,5 $\pm$ 7,5	207,6 $\pm$ 7,4	203,0 $\pm$ 7,6	202,3 $\pm$ 5,6	2,7	1,2	101,2
	300	308,0 $\pm$ 12,0	321,0 $\pm$ 16,7	311,0 $\pm$ 12,2	313,3 $\pm$ 6,8	2,2	4,4	104,4
TIA	500	472,3 $\pm$ 29,9	502,6 $\pm$ 36,0	483,8 $\pm$ 21,1	486,2 $\pm$ 15,3	3,1	-2,7	97,2
	1000	1031,7 $\pm$ 33,0	924,7 $\pm$ 29,3	1065,4 $\pm$ 35,3	1007,3 $\pm$ 73,4	7,3	0,7	100,7
	1500	1396,1 $\pm$ 83,0	1592,8 $\pm$ 51,4	1572,0 $\pm$ 101,0	1520,3 $\pm$ 108,1	7,1	1,3	101,3
TMP	25	24,0 $\pm$ 1,0	28,5 $\pm$ 0,6	27,2 $\pm$ 1,6	26,6 $\pm$ 2,3	8,7	6,4	106,4
	50	47,8 $\pm$ 2,0	56,2 $\pm$ 3,2	51,6 $\pm$ 3,7	51,9 $\pm$ 4,2	8,1	3,8	103,8
	75	68,5 $\pm$ 3,7	79,7 $\pm$ 4,0	76,9 $\pm$ 2,9	75,0 $\pm$ 5,9	7,8	0,05	100,0
TYL	100	96,4 $\pm$ 4,4	97,9 $\pm$ 7,2	105,3 $\pm$ 3,7	99,9 $\pm$ 4,8	4,8	-0,1	99,9
	200	196,6 $\pm$ 10,6	202,1 $\pm$ 12,1	205,1 $\pm$ 6,8	201,2 $\pm$ 4,3	2,1	0,6	100,6
	300	288,0 $\pm$ 12,5	312,7 $\pm$ 15,5	305,1 $\pm$ 14,0	301,9 $\pm$ 12,6	4,2	0,6	100,6

Nota: CTC: clortetraciclina; DXC: doxiciclina; ERY: eritromicina; FLU: flubendazol; LAS: lasalocid; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDM: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina; TMP: trimetoprim; TYL: tilosina.

### 4.3.8 Controle de diluição – precisão e exatidão

Conforme descrito na Tabela 69, foram observadas variações menores do que 10% para todos os analitos dentre as réplicas da amostra de diluição. Os valores de precisão variaram entre 0,2 a 7,9% (CV), enquanto os valores de exatidão variaram entre -9,8 a 7,5% (ER), estando de acordo com a exigência da Diretiva 2002/657/CE (CCE, 2002).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 69 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE CONTROLE DE DILUIÇÃO (continua)

Analitos	Conc. teórica Inicial	Conc. teórica Após diluição (4x)	Analista 1 (Média ± DP)	Analista 2 (Média ± DP)	Geral Média ± DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)
	(µg kg <sup>-1</sup> )						
CTC	800	200	215,3 ± 14,7	198,6 ± 7,7	207,0 ± 11,9	5,7	3,5
DXC	200	50	49,4 ± 2,7	49,0 ± 2,0	49,2 ± 0,3	0,5	-1,6
ERY	600	150	164,0 ± 5,8	149,1 ± 4,8	156,5 ± 10,5	6,7	4,3
FLU	1600	400	404,9 ± 16,1	393,4 ± 7,3	399,1 ± 8,1	2,0	-0,2
LAS	600	150	135,8 ± 2,6	139,1 ± 5,8	137,4 ± 2,3	1,7	-8,4
LIN	200	50	44,5 ± 1,0	45,6 ± 0,8	45,1 ± 0,8	1,7	-9,8
NAR	8	2	2,2 ± 0,1	2,0 ± 0,1	2,1 ± 0,1	4,8	5,4
OTC	800	200	215,1 ± 10,5	210,0 ± 10,9	212,5 ± 3,6	1,7	6,3
SCT	200	50	48,3 ± 1,9	53,1 ± 1,1	50,7 ± 3,4	6,7	1,3
SCP	200	50	53,3 ± 2,7	49,4 ± 3,5	51,4 ± 2,8	5,4	2,7
SDZ	200	50	53,8 ± 3,2	53,7 ± 1,8	53,8 ± 0,1	0,2	7,5
SDMX	200	50	53,5 ± 4,4	52,8 ± 4,2	53,1 ± 0,5	0,9	6,3
SMR	200	50	46,8 ± 2,8	52,1 ± 2,3	49,5 ± 3,8	7,6	-1,1
SMZ	200	50	45,3 ± 1,2	50,3 ± 1,3	47,8 ± 3,5	7,4	-4,5

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 69 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ENSAIO DE CONTROLE DE DILUIÇÃO (conclusão)

Analitos	Conc. teórica Inicial	Conc. teórica Após diluição (4x)	Analista 1 (Média ± DP)	Analista 2 (Média ± DP)	Geral Média ± DP	Precisão (CV%)	Exatidão (ER%, bias)
	(µg kg <sup>-1</sup> )						
SMX	200	50	48,5 ± 2,6	49,3 ± 2,8	48,9 ± 0,6	1,2	-2,2
SMPZ	200	50	51,7 ± 2,8	51,4 ± 2,4	51,6 ± 0,2	0,4	3,1
SQ	200	50	52,5 ± 3,2	49,3 ± 2,9	50,9 ± 2,3	4,6	1,8
STZ	200	50	44,9 ± 1,6	50,2 ± 2,2	47,6 ± 3,7	7,9	-4,8
TC	800	200	198,4 ± 7,9	201,4 ± 6,7	199,9 ± 2,1	1,1	-0,04
TIA	4000	1000	947,5 ± 70,7	1019,5 ± 7,9	983,5 ± 50,9	5,2	-1,6
TMP	200	50	44,0 ± 2,3	49,2 ± 0,9	46,6 ± 3,6	7,8	-6,8
TYL	800	200	197,8 ± 13,6	188,2 ± 13,2	193,0 ± 6,8	3,5	-3,5

Nota: CTC: clortetraciclina; DXC: doxiciclina; ERY: eritromicina; FLU: flubendazol; LAS: lasalocid; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina; TMP: trimetoprim; TYL: tilosina.

### 4.3.9 Robustez

O ensaio de robustez indicou que modificações no volume de acetonitrila (4 ou 6 mL), no tempo de sonicação (8 ou 12 min) e na temperatura de centrifugação (2 ou 6 °C) podem comprometer a precisão dos resultados de alguns compostos.

A diminuição na proporção de acetonitrila (4 mL) foi significativa para a eritromicina (CV=33,2%), lasalocid (CV=11,7%), lincomicina (CV=41,8%), oxitetraciclina (CV=22,9%), sulfadiazina (CV=13,5%), sulfamerazina (CV=24,6%), sulfametoxipiridazina (CV=21,2%) e cambendazol padrão interno (CV=13,5%). Entretanto, o aumento (6 mL) foi significativo para o lasalocid (CV=30,3%), lincomicina (CV=18,2%), narasina (CV=12,7%), oxitetraciclina (CV=18,9%), sulfadiazina (CV=32,1%), sulfamerazina (CV=20,8%), sulfametoxipiridazina (CV=14,9%), demeclociclina (CV=10,6%) e nigericina (CV=14,3%), conforme apresentado na Tabela 70.

A redução do tempo de sonicação (8 min) foi significativa para a eritromicina (CV=27,0%), lasalocid (CV=16,9%), lincomicina (CV=58,1%), narasina (CV=60,9%), oxitetraciclina (CV=11,2%), sulfadiazina (CV=26,7%), sulfamerazina (CV=60,1%), sulfametazina (CV=14,4%), sulfametoxazol (CV=14,3%), nigericina padrão interno (CV=11,8%) e sulfamerazina deuterada (CV=32,7%). Já o aumento (12 min) foi significativo para a eritromicina (CV=66,5%), oxitetraciclina (CV=36,2%), sulfadiazina (CV=14,6%), sulfamerazina (CV=27,2%) e tilosina (CV=46,5%), conforme apresentado na Tabela 71.

A diminuição na temperatura de centrifugação (2 °C) foi significativa para a eritromicina (CV=29,3%), lasalocid (CV=11,9%), oxitetraciclina (CV=22,6%), sulfametoxazol (CV=14,8%), sulfametoxipiridazina (CV=13,9%), tiamulina (CV=9,7%) e trimetoprim (CV=16,0%). Contudo, o aumento (6 °C) foi significativo para a eritromicina (CV=42,0%), lincomicina (CV=36,5%), oxitetraciclina (CV=21,2%), sulfamerazina (CV=13,1%), sulfametoxazol (CV=14,6%), sulfametoxipiridazina (CV=21,5%), tilosina (CV=41,9%) e trimetoprim (CV=16,5%), conforme apresentado na Tabela 72.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

As modificações propostas não comprometeram os resultados de precisão da clortetraciclina, doxíciclina, flubendazol, sulfacetamida, sulfaclorpiridazina, sulfadimetoxina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol e tetraciclina.

Como conclusão, para que resultados confiáveis sejam obtidos, as condições de preparo da amostra devem ser criteriosamente mantidas. É importante mencionar que esses resultados não invalidam o método, apenas especificam quais os pontos críticos, orientando o operador durante a sua execução.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 70 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA PROPORÇÃO DE ACETONITRILA (continua)

Compostos	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 5 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 1 4 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 mL (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Clortetraciclina	200	31633,3 $\pm$ 1518,7	32983,3 $\pm$ 1522,4 -	- 32233,3 $\pm$ 1513,5	32308,3 $\pm$ 954,6 31933,3 $\pm$ 424,3	2,9 1,3
Doxiciclina	50	26800,0 $\pm$ 1247,4	27400,0 $\pm$ 1282,2 -	- 28116,7 $\pm$ 1254,5	27100,0 $\pm$ 424,3 27458,3 $\pm$ 931,0	1,6 3,4
Eritromicina	150	50300,0 $\pm$ 1314,5	31116,7 $\pm$ 1432,01 -	- 47300,0 $\pm$ 2320,3	40733,3 $\pm$ 13529,3 48800,0 $\pm$ 2121,3	33,2 4,3
Flubendazol	400	1071667,0 $\pm$ 40207,8	1095000,0 $\pm$ 45497,3 -	- 1210000,0 $\pm$ 60332,4	1083333,3 $\pm$ 16499,2 1140833,3 $\pm$ 97816,4	1,5 8,6
Lasalocid	150	92366,7 $\pm$ 2891,8	109000,0 $\pm$ 3577,7 -	- 142667,0 $\pm$ 5391,3	100683,3 $\pm$ 11761,5 117516,7 $\pm$ 35567,5	11,7 30,3
Lincomicina	50	25700,0 $\pm$ 1088,1	47250,0 $\pm$ 931,1 -	- 33300,0 $\pm$ 1458,8	36475,0 $\pm$ 15238,1 29500,0 $\pm$ 5374,0	41,8 18,2
Narasina	2	4713,3 $\pm$ 197,0	4403,3 $\pm$ 199,5	5640,0 $\pm$ 188,8	4558,3 $\pm$ 219,2 5176,7 $\pm$ 655,2	4,8 12,7
Oxitetraciclina	200	13800,0 $\pm$ 645,0	9950,0 $\pm$ 274,1 -	- 10550,0 $\pm$ 164,3	11875,0 $\pm$ 2722,4 12175,0 $\pm$ 2298,1	22,9 18,9
Sulfacetamida	50	58150,0 $\pm$ 2686,8	55483,3 $\pm$ 2096,1 -	- 56866,7 $\pm$ 2798,3	56816,7 $\pm$ 1885,6 57508,3 $\pm$ 907,5	3,3 1,6
Sulfaclopiridazina	50	27000,0 $\pm$ 819,8	25250,0 $\pm$ 692,1 -	- 24800,0 $\pm$ 967,5	26125,0 $\pm$ 1237,4 25900,0 $\pm$ 1555,6	4,7 6,0

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 70 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA PROPORÇÃO DE ACETONITRILA (continuação)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 5 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 1 4 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 mL (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Sulfadiazina	50	46300,0 $\pm$ 1314,5	56100,0 $\pm$ 1752,7 -	- 73450,0 $\pm$ 2026,6	51200,0 $\pm$ 6929,7 59875,0 $\pm$ 19197,9	13,5 32,1
Sulfadimetoxina	50	91183,3 $\pm$ 4555,2	101900,0 $\pm$ 1827,6 -	- 103817,0 $\pm$ 4996,2	96541,7 $\pm$ 7577,8 97500,0 $\pm$ 8933,1	7,8 9,2
Sulfamerazina	50	46600,0 $\pm$ 1054,5	32786,7 $\pm$ 480,4 -	- 34633,3 $\pm$ 1132,5	39693,3 $\pm$ 9767,5 40616,7 $\pm$ 8461,7	24,6 20,8
Sulfametazina	50	59850,0 $\pm$ 1697,9	59400,0 $\pm$ 438,2 -	- 54550,0 $\pm$ 1697,9	59625,0 $\pm$ 318,2 57200,0 $\pm$ 3747,7	0,5 6,5
Sulfametoxazol	50	41600,0 $\pm$ 1378,4	44350,0 $\pm$ 1645,3 -	- 36500,0 $\pm$ 1439,4	42975,0 $\pm$ 1944,5 39050,0 $\pm$ 3606,2	4,5 9,2
Sulfametoxipiridazina	50	61533,3 $\pm$ 1017,2	83233,3 $\pm$ 3364,3 -	- 76083,3 $\pm$ 3670,1	72383,3 $\pm$ 15344,2 68808,3 $\pm$ 10288,4	21,2 14,9
Sulfaquinoxalina	50	38366,7 $\pm$ 1785,1	42033,3 $\pm$ 2065,6 -	- 43033,3 $\pm$ 1648,8	40200,0 $\pm$ 2592,7 40700,0 $\pm$ 3299,8	6,4 8,1
Sulfatiazol	50	113692,0 $\pm$ 5053,5	103183,0 $\pm$ 4804,3 -	- 113567,0 $\pm$ 5287,6	108437,5 $\pm$ 7430,5 113629,2 $\pm$ 88,39	6,8 0,1
Tetraciclina	200	116666,6 $\pm$ 4760,9	129500,0 $\pm$ 6534,5 -	- 123000,0 $\pm$ 4774,9	123083,3 $\pm$ 9074,5 119833,3 $\pm$ 4478,3	7,4 3,7
Tiamulina	1000	2825000,0 $\pm$ 49295,0	2875000,0 $\pm$ 38340,6 -	- 2813333,3 $\pm$ 138227,0	2850000 $\pm$ 35355,3 2819167,7 $\pm$ 8249,6	1,2 0,3



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 70 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA PROPORÇÃO DE ACETONITRILA (conclusão)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 5 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 1 4 mL (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 mL (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Tilosina	200	171133,0 $\pm$ 6732,2	163000,0 $\pm$ 7099,3 -	-	167066,7 $\pm$ 5751,1	3,4
				159000,0 $\pm$ 4242,6	165066,7 $\pm$ 8579,6	5,2
Trimetoprim	50	92100,0 $\pm$ 1643,2	88833,3 $\pm$ 3925,6 -	-	90466,7 $\pm$ 2309,9	2,5
				92433,3 $\pm$ 3868,2	92266,7 $\pm$ 235,7	0,3
Cambendazol (PI)	400	1306667,0 $\pm$ 62503,3	1078333,3 $\pm$ 35449,5 -	-	1192500,0 $\pm$ 161456,0	13,5
				1371667,0 $\pm$ 48339,1	1339166,7 $\pm$ 45961,9	3,4
Demeclociclina (PI)	200	45483,3 $\pm$ 2092,3	45500,0 $\pm$ 2093,8 -	-	45491,7 $\pm$ 11,8	0,03
				39116,7 $\pm$ 1622,9	42300,0 $\pm$ 4501,9	10,6
Nigericina (PI)	150	41150,0 $\pm$ 1242,2	40700,0 $\pm$ 1861,2 -	-	40925,0 $\pm$ 318,2	0,8
				50433,3 $\pm$ 1696,7	45791,7 $\pm$ 6564,3	14,3
Sulfamerazina deuterada (PI)	200	18600,0 $\pm$ 819,7	18016,7 $\pm$ 796,0	-	18308,3 $\pm$ 412,5	2,2
				21066,7 $\pm$ 403,3	19833,3 $\pm$ 1744,2	8,8

Nota: PI - padrão interno

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 71 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE SONICAÇÃO (continua)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 10 min (Área $\pm$ DP)	Varição 1 8 min (Área $\pm$ DP)	Varição 2 12 min (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Clortetraciclina	200	31633,3 $\pm$ 1518,7	31166,7 $\pm$ 1072,7 -	- 30900,0 $\pm$ 887,7	31400,0 $\pm$ 330,0 31266,7 $\pm$ 518,5	1,0 1,7
Doxiciclina	50	26800,0 $\pm$ 1247,4	28050,0 $\pm$ 1392,5 -	- 24983,3 $\pm$ 1051,5	27425,0 $\pm$ 883,9 25891,7 $\pm$ 1284,6	3,2 5,0
Eritromicina	150	50300,0 $\pm$ 1314,5	34150,0 $\pm$ 712,0 -	- 139667,0 $\pm$ 4926,1	42225,0 $\pm$ 11419,7 94983,3 $\pm$ 63191,8	27,0 66,5
Flubendazol	400	1071667,0 $\pm$ 40207,8	1068333,3 $\pm$ 37638,6 -	- 1060000,0 $\pm$ 34641,0	1070000,0 $\pm$ 2357,0 1065833,3 $\pm$ 8249,6	0,2 0,8
Lasalocid	150	92366,7 $\pm$ 2891,8	117400,0 $\pm$ 5683,3 -	- 98183,3 $\pm$ 4904,4	104883,3 $\pm$ 17701,2 95275,0 $\pm$ 4113,0	16,9 4,3
Lincomicina	50	25700,0 $\pm$ 1088,1	61500,0 $\pm$ 1095,4 -	- 24800,0 $\pm$ 1252,2	43600,0 $\pm$ 25314,4 25250,0 $\pm$ 636,4	58,1 2,5
Narasina	2	4713,3 $\pm$ 197,0	1876,7 $\pm$ 93,1 -	- 4691,7 $\pm$ 190,1	3295,0 $\pm$ 2005,8 4702,5 $\pm$ 15,32	60,9 0,3
Oxitetraciclina	200	13800,0 $\pm$ 645,0	16166,7 $\pm$ 760,7 -	- 8170,0 $\pm$ 396,7	14983,3 $\pm$ 1673,5 10985,0 $\pm$ 3981,0	11,2 36,2
Sulfacetamida	50	58150,0 $\pm$ 2686,8	55233,3 $\pm$ 2480,0 -	- 54183,3 $\pm$ 1978,3	56691,7 $\pm$ 2062,39 56166,7 $\pm$ 2804,9	3,6 5,0
Sulfaclopiridazina	50	27000,0 $\pm$ 819,8	23200,0 $\pm$ 1084,4 -	- 23850,0 $\pm$ 1120,3	25100,0 $\pm$ 2687,0 25425,0 $\pm$ 2227,4	10,7 8,8

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 71 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE SONICAÇÃO (continuação)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 10 min (Área $\pm$ DP)	Varição 1 8 min (Área $\pm$ DP)	Varição 2 12 min (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Sulfadiazina	50	46300,0 $\pm$ 1314,5	67850,0 $\pm$ 931,1 -	- 56950,0 $\pm$ 2026,6	57075,0 $\pm$ 15238,1 51625,0 $\pm$ 7530,7	26,7 14,6
Sulfadimetoxina	50	91183,3 $\pm$ 4555,2	94083,3 $\pm$ 4327,3 -	- 103850,0 $\pm$ 3517,8	92633,3 $\pm$ 2050,6 97516,7 $\pm$ 8956,7	2,2 9,2
Sulfamerazina	50	46600,0 $\pm$ 1054,5	18800,0 $\pm$ 357,8 -	- 31583,3 $\pm$ 1549,7	32700,0 $\pm$ 19657,6 39091,7 $\pm$ 10618,4	60,1 27,2
Sulfametazina	50	59850,0 $\pm$ 1697,9	48816,7 $\pm$ 861,2 -	- 56750,0 $\pm$ 2174,2	54333,3 $\pm$ 7801,7 58300,0 $\pm$ 2192,0	14,4 3,8
Sulfametoxazol	50	41600,0 $\pm$ 1378,4	50933,3 $\pm$ 948,0 -	- 37683,3 $\pm$ 1661,8	46266,7 $\pm$ 6599,7 39641,7 $\pm$ 2769,5	14,3 7,0
Sulfametoxipiridazina	50	61533,3 $\pm$ 1017,2	68733,3 $\pm$ 2079,1 -	- 63766,7 $\pm$ 2264,2	65133,3 $\pm$ 5091,2 62650,0 $\pm$ 1579,2	7,8 2,5
Sulfaquinoxalina	50	38366,7 $\pm$ 1785,1	39033,3 $\pm$ 1960,3 -	- 41416,7 $\pm$ 1754,3	38700,0 $\pm$ 471,4 39891,7 $\pm$ 2156,7	1,2 5,4
Sulfatiazol	50	113692,0 $\pm$ 5053,5	106267,0 $\pm$ 5185,6 -	- 121800,0 $\pm$ 5081,7	109979,2 $\pm$ 5250,3 117745,8 $\pm$ 5733,5	4,8 4,9
Tetraciclina	200	116666,6 $\pm$ 4760,9	125833,0 $\pm$ 3763,9 -	- 115833,0 $\pm$ 3970,7	121250,0 $\pm$ 6481,8 116250,0 $\pm$ 589,3	5,3 0,5
Tiamulina	1000	2825000,0 $\pm$ 49295,0	2725000,0 $\pm$ 27386,1 -	- 3162667,0 $\pm$ 152979	2775000,0 $\pm$ 70710,7 2993833,3 $\pm$ 238766,4	2,5 8,0

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 71 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NO TEMPO DE SONICAÇÃO (conclusão)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 10 min (Área $\pm$ DP)	Varição 1 8 min (Área $\pm$ DP)	Varição 2 12 min (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Tilosina	200	171133,0 $\pm$ 6732,2	177333,0 $\pm$ 5955,4 -	- 86450,0 $\pm$ 3754,3	174233,3 $\pm$ 4384,1 128791,7 $\pm$ 59880,2	2,5 46,5
Trimetoprim	50	92100,0 $\pm$ 1643,2	102067,0 $\pm$ 4659,5 -	- 90050,0 $\pm$ 4265,1	97083,3 $\pm$ 7047,5 91075,0 $\pm$ 1449,6	7,3 1,6
Cambendazol (PI)	400	1306667,0 $\pm$ 62503,3	1163333,3 $\pm$ 37238,0 -	- 1285000,0 $\pm$ 43703,5	1235000,0 $\pm$ 101352,0 1295833,3 $\pm$ 15320,6	8,2 1,2
Demeclociclina (PI)	200	45483,3 $\pm$ 2092,3	43116,7 $\pm$ 1817,0 -	- 46333,3 $\pm$ 1882,2	44300,0 $\pm$ 1673,5 45908,3 $\pm$ 601,0	3,8 1,3
Nigericina (PI)	150	41150,0 $\pm$ 1242,2	34800,0 $\pm$ 1495,3 -	- 45833,3 $\pm$ 2037,3	37975,0 $\pm$ 4490,1 43491,7 $\pm$ 3311,6	11,8 7,6
Sulfamerazina deuterada (PI)	200	18600,0 $\pm$ 819,7	29800,0 $\pm$ 675,3 -	- 18833,3 $\pm$ 728,5	24200,0 $\pm$ 7919,6 18716,7 $\pm$ 165,0	32,7 0,9

Nota: PI - padrão interno

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 72 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA TEMPERATURA DE CENTRIFUGAÇÃO (continua)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 4 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 1 2 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 °C (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Clortetraciclina	200	31633,3 $\pm$ 1518,7	32616,7 $\pm$ 1413,4 -	- 31166,7 $\pm$ 1513,5	32125,0 $\pm$ 695,3 31400,0 $\pm$ 330,0	2,2 1,0
Doxiciclina	50	26800,0 $\pm$ 1247,4	29516,7 $\pm$ 947,4 -	- 28183,3 $\pm$ 1066,6	28158,3 $\pm$ 1921,0 27491,7 $\pm$ 978,2	6,8 3,6
Eritromicina	150	50300,0 $\pm$ 1314,5	33050,0 $\pm$ 1150,2 -	- 92750,0 $\pm$ 1807,5	41675,0 $\pm$ 12197,6 71525,0 $\pm$ 30016,68	29,3 42,0
Flubendazol	400	1071667,0 $\pm$ 40207,8	1111667,0 $\pm$ 44007,6 -	- 1130000,0 $\pm$ 30983,9	1091666,7 $\pm$ 28284,3 1100833,3 $\pm$ 41247,9	2,6 3,7
Lasalocid	150	92366,7 $\pm$ 2891,8	109333,3 $\pm$ 4633,2 -	- 98933,3 $\pm$ 3989,3	100850,0 $\pm$ 11997,2 95650,0 $\pm$ 4643,3	11,9 4,8
Lincomicina	50	25700,0 $\pm$ 1088,1	27100,0 $\pm$ 438,2 -	- 24666,7 $\pm$ 671,3	26400,0 $\pm$ 990,0 33258,3 $\pm$ 12150,4	3,7 36,5
Narasina	2	4713,3 $\pm$ 197,0	5526,7 $\pm$ 261,3 -	- 4593,3 $\pm$ 216,0	5120,0 $\pm$ 575,1 4653,3 $\pm$ 84,8	11,2 1,8
Oxitetraciclina	200	13800,0 $\pm$ 645,0	9996,7 $\pm$ 470,9 -	- 10200,0 $\pm$ 236,6	11898,3 $\pm$ 2689,4 12000,0 $\pm$ 2545,6	22,6 21,2
Sulfacetamida	50	58150,0 $\pm$ 2686,8	55750,0 $\pm$ 2657,6 -	- 54316,7 $\pm$ 1752,0	56950,0 $\pm$ 1697,1 56233,3 $\pm$ 2710,6	3,0 4,8
Sulfaclopiridazina	50	27000,0 $\pm$ 819,8	26616,7 $\pm$ 1348,2 -	- 26066,7 $\pm$ 1297,2	26808,3 $\pm$ 271,1 26533,3 $\pm$ 660,0	1,0 2,5

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 72 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA TEMPERATURA DE CENTRIFUGAÇÃO (continuação)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 4 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 1 2 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 °C (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Sulfadiazina	50	46300,0 $\pm$ 1314,5	47733,3 $\pm$ 904,8 -	- 46233,3 $\pm$ 1610,8	47016,7 $\pm$ 1013,5 46266,7 $\pm$ 47,1	2,2 0,1
Sulfadimetoxina	50	91183,3 $\pm$ 4555,2	104083,0 $\pm$ 5024,1 -	- 104317,0 $\pm$ 6767,7	97633,3 $\pm$ 9121,7 97750,0 $\pm$ 9286,7	9,3 9,5
Sulfamerazina	50	46600,0 $\pm$ 1054,5	39900,0 $\pm$ 558,6 -	- 38700,0 $\pm$ 802,5	43250,0 $\pm$ 4737,6 42650,0 $\pm$ 5586,1	10,9 13,1
Sulfametazina	50	59850,0 $\pm$ 1697,9	56050,0 $\pm$ 1588,4 -	- 56150,0 $\pm$ 1588,4	57950,0 $\pm$ 2687,0 58000,0 $\pm$ 2616,3	4,6 4,5
Sulfametoxazol	50	41600,0 $\pm$ 1378,4	33716,7 $\pm$ 1189,0 -	- 33800,0 $\pm$ 296,6	37658,3 $\pm$ 5574,4 37700,0 $\pm$ 5515,4	14,8 14,6
Sulfametoxipiridazina	50	61533,3 $\pm$ 1017,2	50500,0 $\pm$ 1314,5 -	- 49466,7 $\pm$ 1342,6	56016,7 $\pm$ 7801,7 58350,0 $\pm$ 12562,9	13,9 21,5
Sulfaquinoxalina	50	38366,7 $\pm$ 1785,1	41966,7 $\pm$ 1804,1 -	- 42066,7 $\pm$ 2898,0	40166,7 $\pm$ 2545,6 40216,7 $\pm$ 2616,3	6,3 6,5
Sulfatiazol	50	113692,0 $\pm$ 5053,5	115875,0 $\pm$ 4951,6 -	- 106975,0 $\pm$ 4756,9	114783,3 $\pm$ 1543,8 110333,3 $\pm$ 4749,4	1,3 4,3
Tetraciclina	200	116666,6 $\pm$ 4760,9	127167,0 $\pm$ 4622,4 -	- 116000,0 $\pm$ 4242,6	121916,7 $\pm$ 7424,6 116333,3 $\pm$ 471,4	6,1 0,4
Tiamulina	1000	2825000,0 $\pm$ 49295,0	3240000,0 $\pm$ 94657,3 -	- 3039000,0 $\pm$ 31767,9	3032500,0 $\pm$ 293449,3 2932000,0 $\pm$ 151320,8	9,7 5,2

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

TABELA 72 – RESULTADO DO ENSAIO DE ROBUSTEZ - MODIFICAÇÃO NA TEMPERATURA DE CENTRIFUGAÇÃO (conclusão)

Analito	Concentração ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Nominal 4 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 1 2 °C (Área $\pm$ DP)	Varição 2 6 °C (Área $\pm$ DP)	Média (Área $\pm$ DP)	CV (%)
Tilosina	200	171133,0 $\pm$ 6732,2	192667,0 $\pm$ 2732,5 -	- 92900,0 $\pm$ 3482,5	181900,0 $\pm$ 15226,4 132016,7 $\pm$ 55319,3	8,4 41,9
Trimetoprim	50	92100,0 $\pm$ 1643,2	73333,3 $\pm$ 2040,3 -	- 72900,0 $\pm$ 1971,8	82716,7 $\pm$ 13270,0 82500,0 $\pm$ 13576,4	16,0 16,5
Cambendazol (PI)	400	1306667,0 $\pm$ 62503,3	1255000,0 $\pm$ 52057,7 -	- 1361667,0 $\pm$ 49564,8	1280833,3 $\pm$ 36533,8 1334166,7 $\pm$ 38890,9	2,8 2,9
Demeclociclina (PI)	200	45483,3 $\pm$ 2092,3	45683,3 $\pm$ 2063,4 -	- 43433,3 $\pm$ 2048,1	45583,3 $\pm$ 141,4 44458,3 $\pm$ 1449,6	0,3 3,3
Nigericina (PI)	150	41150,0 $\pm$ 1242,2	46750,0 $\pm$ 1036,8 -	- 43266,7 $\pm$ 1373,6	43950,0 $\pm$ 3959,8 42208,3 $\pm$ 1496,7	9,0 3,5
Sulfamerazina deuterada (PI)	200	18600,0 $\pm$ 819,7	20966,7 $\pm$ 926,6 -	- 20250,0 $\pm$ 884,9	19783,3 $\pm$ 1673,5 19425,0 $\pm$ 1166,7	8,5 6,0

Nota: PI - padrão interno

### 4.3.10 Estabilidade

#### 4.3.10.1 Estabilidade dos analitos em solução

Para a estabilidade em solução foi aplicado um limiar de 80%, considerando a variabilidade intrínseca do espectrômetro de massas (CROUBELS; DE BAERE; DE BACKER, 2003).

Após o período de uma semana foi observado, para todas as condições de armazenamento, a degradação da demeclociclina, doxiciclina, lasalocid, narasina, sulfametoxazol, sulfametazina, tetraciclina, tiamulina e trimetoprim (entre 18,98 a 72,23% de analito remanescente).

Após o período de duas semanas de armazenamento, somente a sulfacetamida, a sulfaclopiridazina, a sulfamerazina e a sulfaquinoxalina permaneceram estáveis em todas as condições. Por esse mesmo período, permaneceram estáveis a -40 °C a oxitetraciclina e o cambendazol; a 4 °C a oxitetraciclina, a sulfamerazina deuterada e a sulfametoxipiridazina; a 20 °C (ao abrigo da luz) o cambendazol e a 20 °C (exposto à luz) a sulfadiazina e o cambendazol.

A lincomicina permaneceu estável pelo período de três semanas quando armazenada a 4, -40 e 20 °C (ao abrigo da luz). Somente a sulfadimetoxina foi estável em todas as condições de armazenamento após esse mesmo período.

Uma rápida fotodegradação foi evidenciada para as tetraciclinas (Figura 52). Segundo Oka (1989), a tetraciclina, quando em solução aquosa pH 7 e exposta a irradiação por 3 horas a 30 °C, degrada em aproximadamente 50%. Soeborg (2004) avaliou o efeito da temperatura para a clortetraciclina e concluiu que a degradação é mais rápida quando armazenada a 20 °C do que a 6 °C.

Portanto, conclui-se que essas soluções devem ser utilizadas imediatamente após o preparo. Os resultados dos testes de estabilidade em solução são ilustrados nas Figuras 52 a 56.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

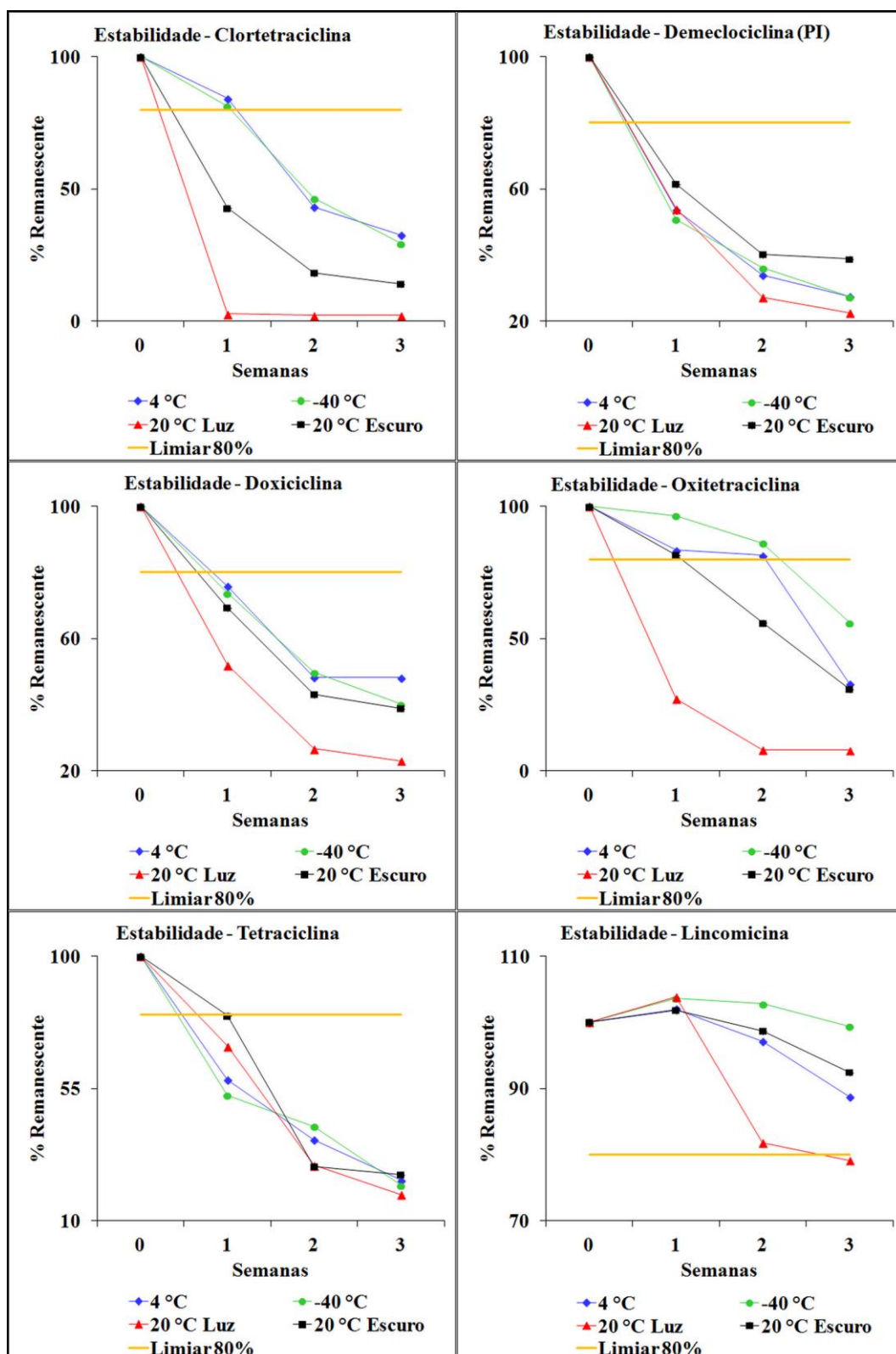


FIGURA 52 – ESTABILIDADE DA CLORTETRACICLINA, DEMECLOCICLINA, DOXICICLINA, OXITETRACICLINA, TETRACICLINA E LINCOMICINA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Nota: PI: padrão interno

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

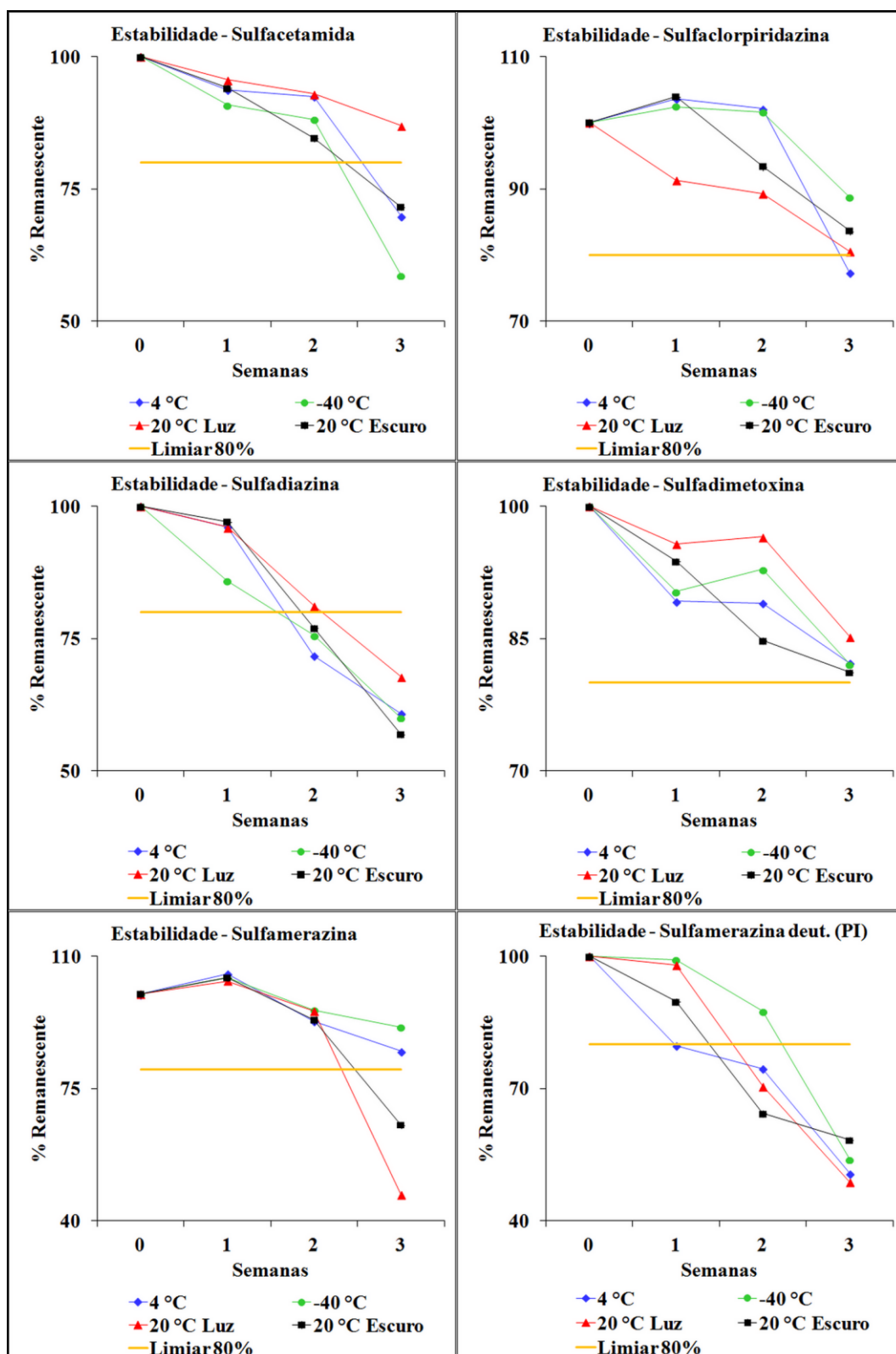


FIGURA 53 – ESTABILIDADE DA SULFACETAMIDA, SULFACLOPIRIDAZINA, SULFADIAZINA, SULFADIMETOXINA, SULFAMERAZINA E SULFAMERAZINA DEUTERADA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES  
Nota: PI: padrão interno

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

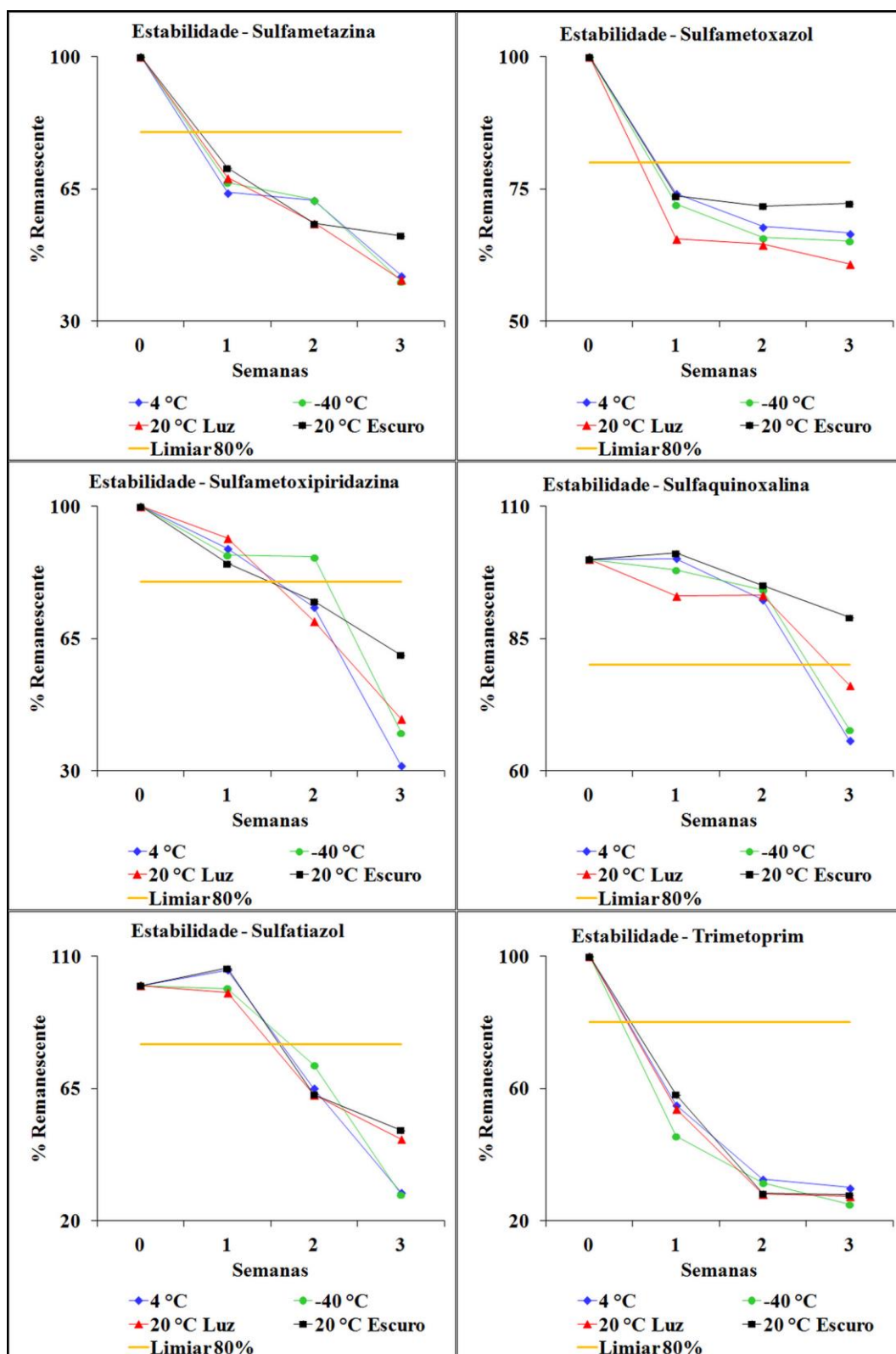


FIGURA 54 – ESTABILIDADE DA SULFAMETAZINA, SULFAMETOXAZOL, SULFAMETOXIPIRIDAZINA, SULFAQUINOXALINA, SULFATIAZOL E TRIMETOPRIM EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

Nota: PI: padrão interno

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

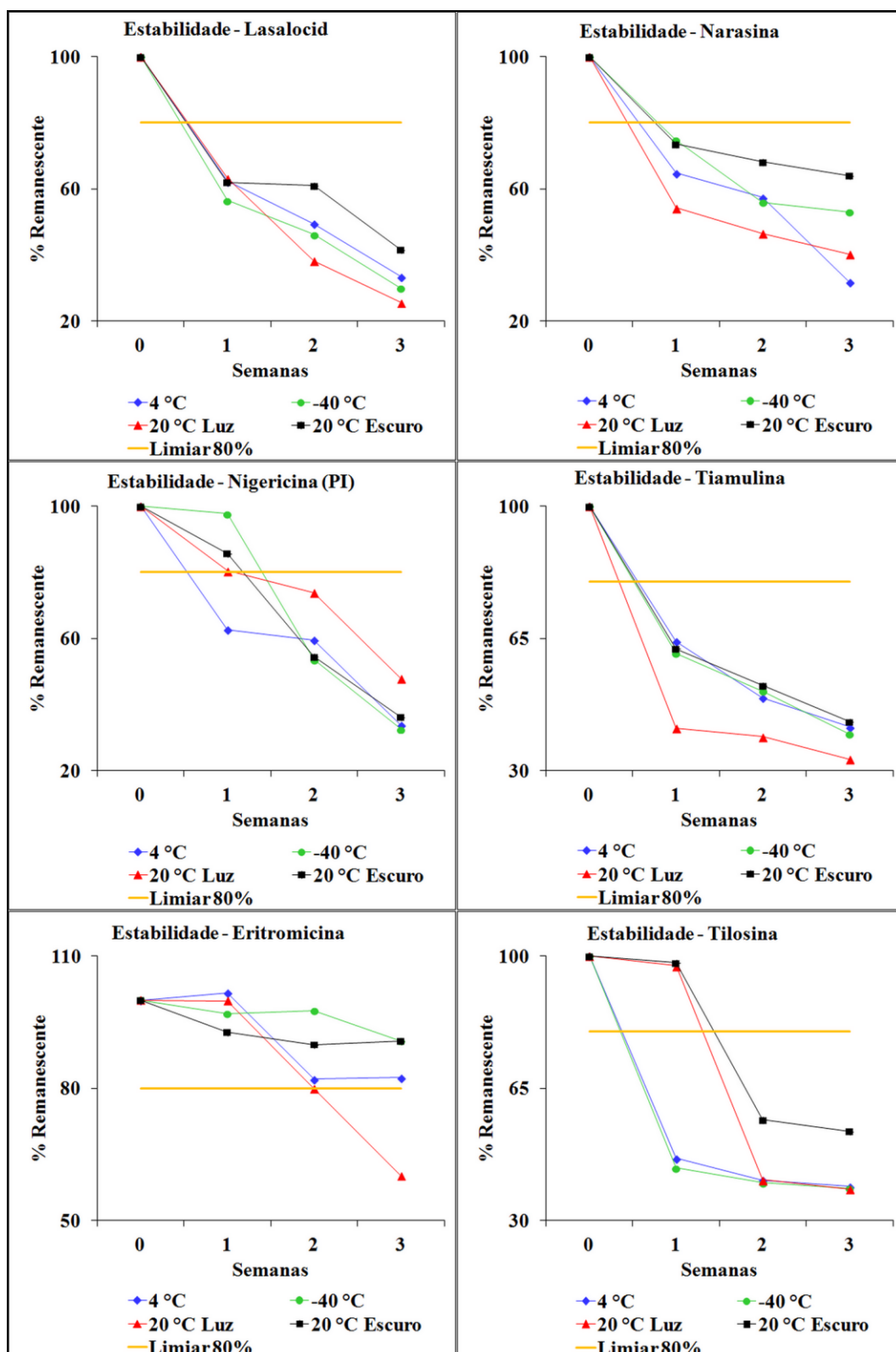


FIGURA 55 – ESTABILIDADE DO LASALOCID, NARASINA, NIGERICINA, TIAMULINA, ERITROMICINA E TILOSINA EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES

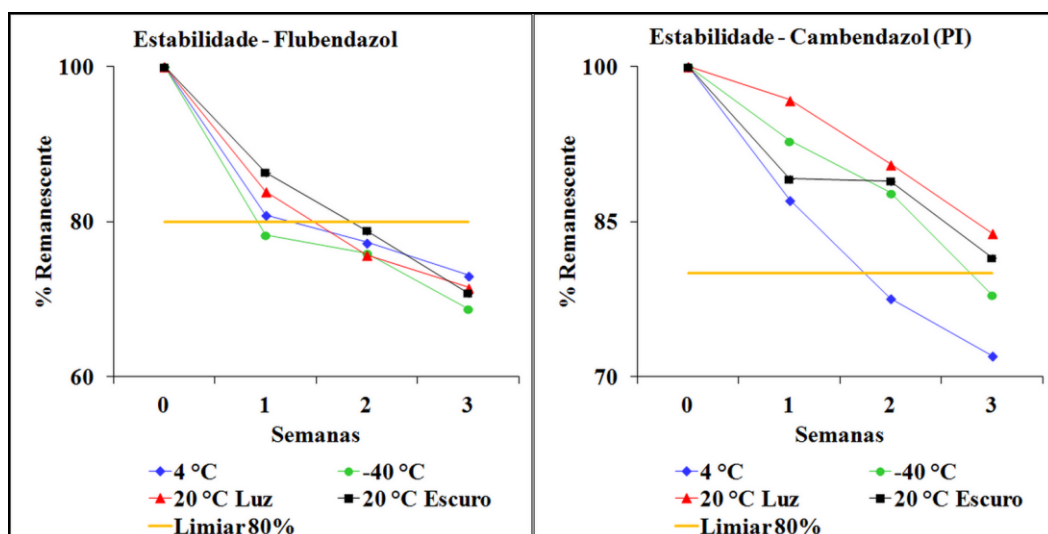


FIGURA 56 – ESTABILIDADE DO FLUBENDAZOL E CAMBENDAZOL EM SOLUÇÃO APÓS O PERÍODO DE 1, 2 E 3 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO SOB DIFERENTES CONDIÇÕES  
Nota: PI: padrão interno

### 4.3.10.2 Estabilidade dos analitos em matriz

Para a estabilidade em matriz foi aplicado um limiar de 80 a 110%, considerando o parâmetro de veracidade mínima, o qual estipula uma exatidão de -20 a +10% para analitos com concentração superior a  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  (CCE, 2002; CROUBELS; DE BAERE; DE BACKER, 2003).

Ao analisar os resultados, observou-se uma reduzida estabilidade para a maioria dos analitos e tal fato pode ser justificado pelo pH do ovo. Segundo Kan (2003), a gema possui pH 6 enquanto a clara pH 7,6. Entretanto, o pH da clara pode variar ao longo do tempo. No ovo recém-colocado, o pH da clara varia de 7,6 a 7,9, porém quando este se torna velho o pH pode atingir o valor de 9,5 devido a liberação de dióxido de carbono (Figueiredo, 2011).

Ao observar os gráficos de estabilidade (Figura 57), verifica-se que a estabilidade das tetraciclina é inferior a três semanas. Segundo Soeborg (2004), o  $\text{pH} > 7$  contribui para a degradação da clortetraciclina (formação de iso-clortetraciclina), bem como para a sua máxima complexação com íons  $\text{Ca}^{2+}$ . Tendo em vista a similaridade estrutural das tetraciclina, pode-se sugerir que o mesmo ocorra com as demais.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de quatro semanas, somente a sulfaclorpiridazina e a narasina se mantiveram estáveis. Resultados similares foram observados por Spisso (2010) e Tolika (2011).

É importante enfatizar que esses resultados foram obtidos com amostras de ovo previamente homogeneizadas e fracionadas. Tais resultados não devem ser extrapolados para amostras de ovo *in natura*, uma vez que a gema e a clara estão separadas, preservando valores distintos de pH. Além disso, a distribuição das drogas na clara, na gema ou em ambas ocorre em função das suas propriedades físico-químicas, o que pode influenciar na estabilidade do analito. Portanto, sugere-se que a análise das amostras seja realizada a fresco, ou seja, logo após a abertura do ovo e sua homogeneização.

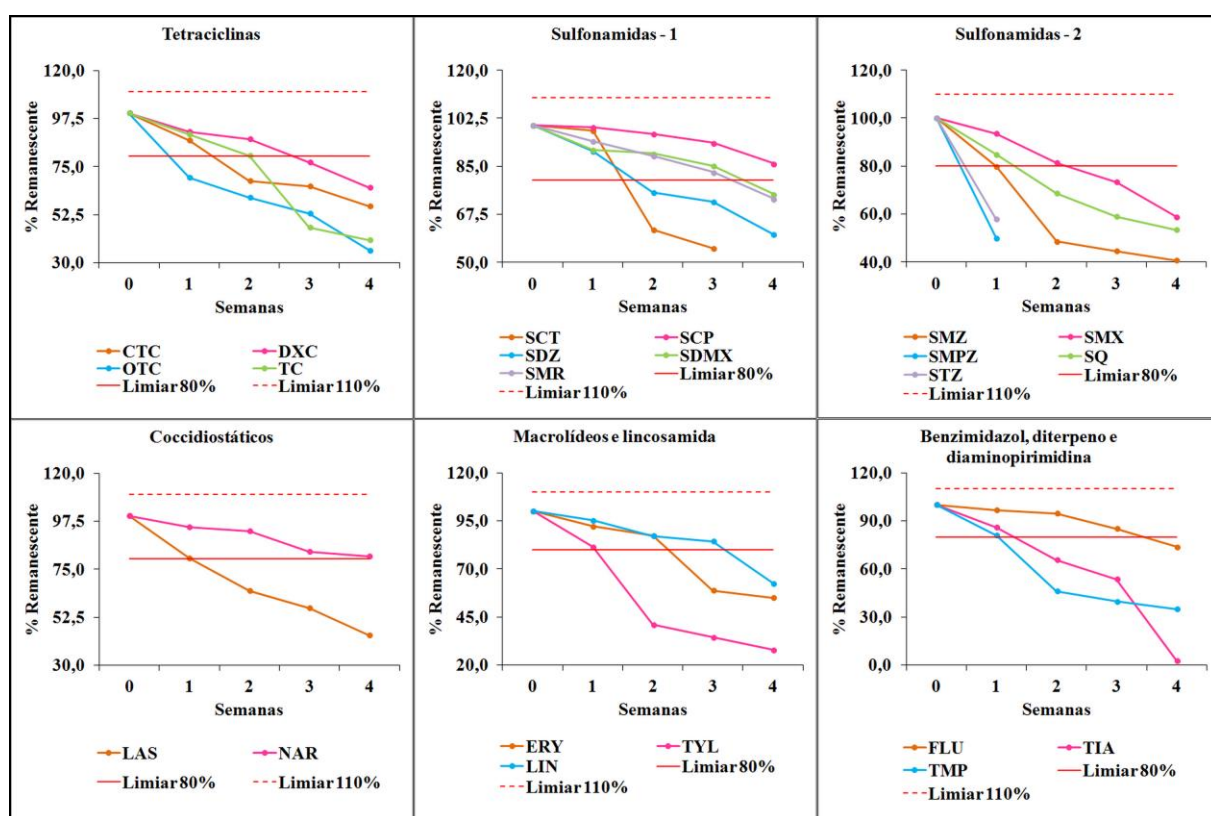


FIGURA 57 – ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM MATRIZ APÓS O PERÍODO DE 1, 2, 3 E 4 SEMANAS DE ARMAZENAMENTO EM FREEZER A -40 °C

Nota: CTC: clortetraciclina; DXC: doxiciclina; ERY: eritromicina; FLU: flubendazol; LAS: lasalocid; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetraciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclorpiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina; TMP: trimetoprim; TYL: tilosina.



### 4.3.10.3 Estabilidade dos analitos em amostra pós-processamento

A estabilidade dos analitos em amostra pós-processamento foi avaliada comparando a recuperação de cada analito obtida de amostras recém-preparadas com aquela obtida após um período de 24 e 48 horas no gerenciador de amostras a 20 °C.

Nessas condições nenhum analito apresentou degradação, pois a porcentagem remanescente ficou entre 80 a 110%, conforme ilustrado na Figura 58. Portanto, conclui-se que as amostras pós-processamento podem permanecer por até 48 horas no gerenciador de amostras a 20 °C, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados.

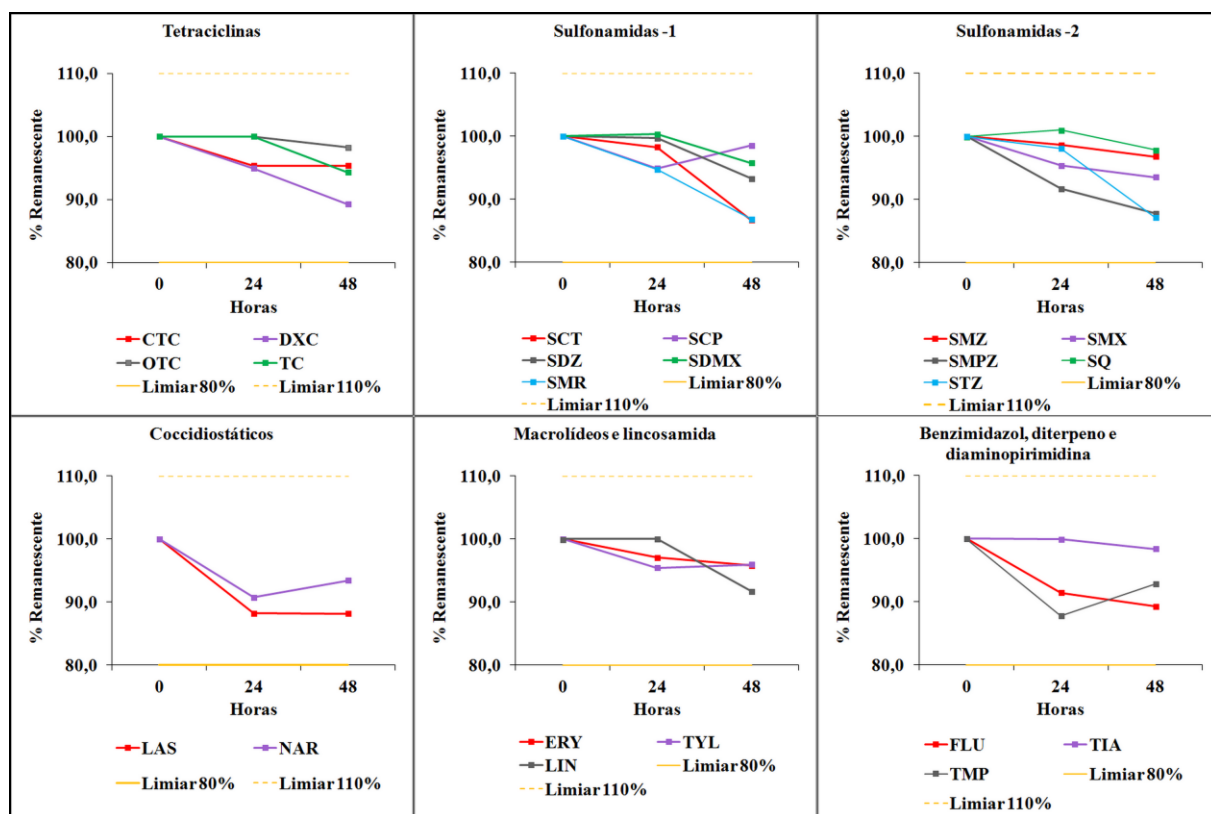


FIGURA 58 – ESTABILIDADE DOS ANALITOS EM AMOSTRA PÓS-PROCESSAMENTO APÓS O PERÍODO DE 24 E 48 HORAS DE ARMAZENAMENTO EM GERENCIADOR DE AMOSTRAS A 20 °C

Nota: CTC: clortetraciclina; DXC: doxiciclina; ERY: eritromicina; FLU: flubendazol; LAS: lasalocid; LIN: lincomicina; NAR: narasina; OTC: oxitetetraciclina; SCT: sulfacetamida; SCP: sulfaclopiridazina; SDZ: sulfadiazina; SDMX: sulfadimetoxina; SMR: sulfamerazina; SMZ: sulfametazina; SMX: sulfametoxazol; SMPZ: sulfametoxipiridazina; SQ: sulfaquinoxalina; STZ: sulfatiazol; TC: tetraciclina; TIA: tiamulina; TMP: trimetoprim; TYL: tilosina.

### 4.4 DETERMINAÇÃO DOS RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS VETERINÁRIOS EM AMOSTRAS DE OVOS UTILIZANDO LC-MS/MS

Foram analisadas 15 amostras de ovo, procedentes de granjas localizadas em diferentes cidades do Estado do Paraná, como Curitiba, Santo Antônio do Sudoeste, Arapongas, Francisco Beltrão, Diamante do Norte, Cruzeiro do Sul, Fazenda Rio Grande, Terra Rica e São José dos Pinhais.

Cada amostra foi preparada conforme descrito na Seção 3.7, em sextuplicata, e analisada pelo método desenvolvido. Após as análises foi verificado que somente a Amostra 13 (Tabela 73) apresentou resíduos de medicamentos veterinários, os quais correspondiam a doxiciclina ( $538,02 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), sulfametoxazol ( $635,25 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) e trimetoprim ( $241,06 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). O cromatograma é apresentado na Figura 59.

TABELA 73 – RESULTADO OBTIDO COM AMOSTRAS DE OVOS ANALISADAS PELO MÉTODO DESENVOLVIDO

Amostra	Resultado da análise	Observação
1	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
2	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
3	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
4	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
5	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
6	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
7	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
8	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
9	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
10	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
11	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
12	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
13	Não conforme	Resíduos de doxiciclina, sulfametoxazol e trimetoprim
14	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado
15	Conforme	Nenhum resíduo foi detectado



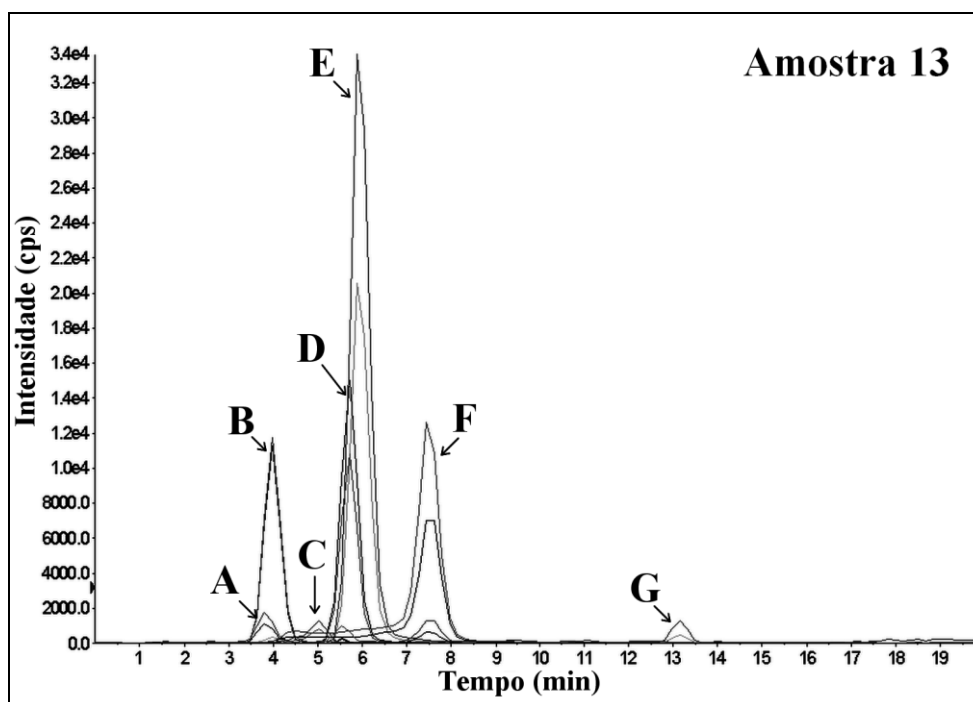


FIGURA 59 – CROMATOGRAMA DA AMOSTRA 13 OBTIDO POR LC-MS/MS

Nota: A: sulfamerazina deuterada (padrão interno); B: trimetoprim; C: demeclociclina (padrão interno); D: sulfametoxazol; E: cambendazol (padrão interno); F: doxiciclina e G: nigericina (padrão interno).

Levando em consideração o consumo de um ovo (peso médio de 50 g) contendo esses resíduos, pode-se afirmar a ingestão de aproximadamente 27  $\mu\text{g}$  de doxiciclina, 32  $\mu\text{g}$  de sulfametoxazol e 12  $\mu\text{g}$  de trimetoprim. É importante ressaltar que algumas pessoas apresentam sensibilidade a esses medicamentos, mesmo em pequenas quantidades. Além disso, eles pertencem ao grupo de substâncias que têm o uso proibido na avicultura poedeira, ou seja, a presença de resíduos não é tolerada.

---

## 5. CONCLUSÃO

---

## CONCLUSÃO

---

Um método simples, sensível e eficiente foi desenvolvido por LC-MS/MS para a identificação e quantificação simultânea de 22 fármacos de uso veterinário em ovos.

As principais vantagens do método desenvolvido, em relação aos métodos já descritos na literatura, incluem a facilidade, a rapidez e o menor custo no preparo das amostras, uma vez que utiliza uma extração simples com acetonitrila.

Os parâmetros validados para o método desenvolvido demonstraram seletividade, sensibilidade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis de acordo com a Diretiva 2002/657/EC.

O estudo de robustez indicou que todas as modificações propostas foram críticas para um ou outro analito e, em função disso, as condições do método de extração devem ser criteriosamente mantidas.

Os resultados obtidos com o estudo de estabilidade indicaram que as soluções devem ser utilizadas imediatamente após o preparo e que as amostras de ovo devem ser analisadas a fresco, ou seja, logo após a abertura e homogeneização. Já as amostras pós-processamento podem permanecer por até 48 horas no gerenciador de amostras a 20 °C, sem prejudicar a confiabilidade dos resultados.

Quando analisadas as 15 amostras de ovos, produzidas em granjas localizadas no Estado do Paraná, somente uma apresentou resíduos de medicamentos veterinários (doxiciclina, sulfametoxazol e trimetoprim), demonstrando a aplicação e a importância do novo método.

As perspectivas futuras envolvem tanto a análise de mais amostras de ovo quanto a implementação do método desenvolvido na rotina de análises do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR), possibilitando o monitoramento desse alimento.

Por fim, conclui-se que o controle dos resíduos de medicamentos veterinários em ovos é importante para a segurança alimentar da população e que se faz necessária a adoção de uma política de orientação aos produtores quanto à necessidade de boas práticas na avicultura poedeira e a não utilização de medicamentos proibidos.

---

## REFERÊNCIAS

---

AERTS, M. M.; HOGENBOOM, A. C.; BRINKMAN, U. A. Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 667, n. 1, p.1-40, 1995.

AI, L.; SUN, H.; WANG, F.; CHEN, R.; GUO, C. Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 20, p.1757-1763, 2011.

ALFREDSSON, G.; BRANZELL, C.; GRANELLI, K.; LUNDSTROM, A. Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 529, n. 1-2, p.47-51, 2005.

ARCA. Notícias da ARCA. Disponível em: <<http://www.arcabrasil.org.br/blog/2010/03/questao-de-etiqueta/>> Acesso em: 05/10/2015.

ANVISA. **Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo – PAMVet (2003)**. Disponível em:<<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/pamvet/pamvet.pdf>> Acesso em: 03/09/2011.

ANVISA. **Programa de análise de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos de origem animal - PAMVet. Relatório 2006-2007. Monitoramento de Resíduos em Leite Exposto ao Consumo (5º e 6º anos de atividades)**. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/72efdb0047458ad19441d43fbc4c6735/PAMVET.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em: 02/07/2015.

BARBOSA, J.; FREITAS, A.; MOURÃO, J. L.; NORONHA DA SILVEIRA, M. I.; RAMOS, F. Determination of Furaltadone and Nifursol Residues in Poultry Eggs by Liquid Chromatography - Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 17, p.4227-4234, 2012.

BISTOLETTI, M.; MORENO, L.; ALVAREZ, L.; LANUSSE, C. Multiresidue HPLC method to measure benzimidazole anthelmintics in plasma and egg from laying hens. Evaluation of albendazole metabolites residue profiles. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p.793-800, 2011.

BOCK, C.; STACHEL, C.; GOWIK, P. Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the software InterVal. **Analytica Chimica Acta**, v. 586, n. 1-2, p.348-358, 2007.

BOGIALLI, S.; CIAMPANELLA, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A. Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 40, p.6810-6815, 2009.

## REFERÊNCIAS

---

BOGIALLI, S.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; POLCI, M. L. Rapid confirmatory assay for determining 12 sulfonamide antimicrobials in milk and eggs by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 15, p.4225-4232, 2003.

BOGIALLI, S.; D'ASCENZO, G.; DI CORCIA, A.; LAGANA, A.; TRAMONTANA, G. Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 5, p.794-800, 2009.

BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 4, p.947-66, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 42, de 20 de dezembro de 1999. Alterar o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 dez. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 02 fev. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resolução RDC n. 53, de 2 de outubro de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico MERCOSUL - Metodologias Analíticas, Ingestão Diária Admissível e Limites Máximos de Resíduos para Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 out. 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 27, de 17 de maio de 2012. Diário Oficial da União. Dispõe sobre os requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 maio 2012b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Ofício circular DOI/DIPOA n. 60/99. Registro do Produto "Ovos Caipira" ou "Ovos Tipo ou Estilo Caipira" ou "Ovos Colonial" ou "Ovos Tipo ou Estilo Colonial". **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 04 nov. 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.323, de 27 de dezembro de 2007. Regulamenta a lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 27 dez. 2007.

## REFERÊNCIAS

---

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria SDA n. 22, de 07 de abril de 2015. Divulga os resultados do subprograma de monitoramento e do subprograma exploratório do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes - PNCRC do ano 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 abr. 2015.

BRUNO, F.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; PALLAGROSI, M. An original approach to determining traces of tetracycline antibiotics in milk and eggs by solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 14, p.1365-1376, 2002.

CANNAVAN, A.;KENNEDY, D. G. Determination of dimetridazole in poultry tissues and eggs using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. **Analyst**, v. 122, n. 9, p.963-966, 1997.

CAPRIOTTI, A. L.; CAVALIERE, C.; PIOVESANA, S.; SAMPERI, R.; LAGANÀ, A. Multiclass screening method based on solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of antimicrobials and mycotoxins in egg. **Journal of Chromatography A**, v. 1268, n., p.84-90, 2012.

CAVALIERE, C.; CURINI, R.; DI CORCIA, A.; NAZZARI, M.; SAMPERI, R. A Simple and Sensitive Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Confirmatory Method for Analyzing Sulfonamide Antibacterials in Milk and Egg. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p.558-566, 2002.

CCE. Directiva 96/23/CE do Conselho, de 29 abril de 1996. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 1996, L 125, 11.

CCE. Directiva 2002/657/CE do Conselho, 12 agosto de 2002. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 2002, L 221, 8.

CCE. Comissão Regulation (EC) n.124/2009, de 10 de fevereiro de 2009a. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**.

CCE. Comissão Regulation (EU) n. 37/2010 de 22 de dezembro de 2009b. **Jornal Oficial das Comunidades Europeias**. 2010R0037.

CHO, H. J.; YI, H.; CHO, S. M.; LEE, D. G.; CHO, K.; ABD EL-ATY, A. M.; SHIM, J. H.; LEE, S. H.; JEONG, J. Y.; SHIN, H. C. Single-step extraction followed by LC for determination of (fluoro)quinolone drug residues in muscle, eggs, and milk. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 8, p.1034-1043, 2010.

CHRISTODOULOU, E. A.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, L. N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. **Journal of Chromatography B**, v. 859, n. 2, p.246-255, 2007.

## REFERÊNCIAS

---

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. Qualidade de medições em química analítica. Estudo de caso: determinação de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica com chama **Química Nova**, v. 24, n. 3, p.374-380, 2001.

CODEX. **Codex Alimentarius Commission. Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods. Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission (July 2012).** Disponível em:<[http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2\\_e\\_2012.pdf](http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/MRL2_e_2012.pdf)> Acesso em: 10/07/2015.

COOPER, A. D.; STUBBINGS, G. W. F.; KELLY, M.; TARBIN, J. A.; FARRINGTON, W. H. H.; SHEARER, G. Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high-performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1-2, p.321-326, 1998.

CRONLY, M.; BEHAN, P.; FOLEY, B.; MALONE, E.; REGAN, L. Rapid confirmatory method for the determination of 11 nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p.8101-8109, 2009.

CROUBELS, S.; DE BAERE, S.; DE BACKER, P. Practical approach for the stability testing of veterinary drugs in solutions and in biological matrices during storage. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, n. 1-2, p.419-427, 2003.

CROUBELS, S. M.; VANOOSTHUYZE, K. E. I.; VANPETEGHEM, C. H. Use of metal chelate affinity chromatography and membrane-based ion-exchange as clean-up procedure for trace residue analysis of tetracyclines in animal tissues and egg. **Journal of Chromatography B**, v. 690, n. 1-2, p.173-179, 1997.

CUI, X.; SHAO, B.; ZHAO, R.; YANG, Y.; HU, J.; TU, X. Simultaneous determination of seventeen glucocorticoids residues in milk and eggs by ultra-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 15, p.2355-2364, 2006.

DASENAKI, M. E.; THOMAIDIS, N. S. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 880, n., p.103-21, 2015.

DE LA CRUZ, M. N. S.; SOARES, R. F.; MARQUES, A. S. F.; AQUINO-NETO, F. R. Development and validation of analytical method for sulfonamide residues in eggs by liquid chromatography tandem mass spectrometry based on the Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 3, p.454-461, 2011.



DE PAULA, F. C.; DE PIETRO, A. C.; CASS, Q. B. Simultaneous quantification of sulfamethoxazole and trimethoprim in whole egg samples by column-switching high-performance liquid chromatography using restricted access media column for on-line sample clean-up. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1-2, p.221-226, 2008.

DE RUYCK, H.; DAESELEIRE, E.; GRIJSPEERDT, K.; DE RIDDER, H.; VAN RENTERGHEM, R.; HUYGHEBAERT, G. Determination of flubendazole and its metabolites in eggs and poultry muscle with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 2, p.610-617, 2001.

DE RUYCK, H.; DE RIDDER, H.; VAN RENTERGHEM, R.; VAN WAMBEKE, F. Validation of HPLC method of analysis of tetracycline residues in eggs and broiler meat and its application to a feeding trial. **Food Additives and Contaminants**, v. 16, n. 2, p.47-56, 1999.

DENG, X. J.; YANG, H. Q.; LI, J. Z.; SONG, Y.; GUO, D. H.; LUO, Y.; DU, X. N.; BO, T. Multiclass Residues Screening of 105 Veterinary Drugs in Meat, Milk, and Egg Using Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 19, p.2286-2303, 2011.

DMITROVIC, J.; DURDEN, D. A. A New Approach to the Analysis of Nicarbazin and Ionophores in Eggs by HPLC/MS/MS. **Journal of AOAC International**, v. 94, n. 2, p.428-435, 2011.

DOOLEY, K. C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. **Clinical Biochemistry**, v. 36, n. 6, p.471-481, 2003.

DOWLING, G.; O'KEEFFE, M.; SMYTH, M. R. Determination of robenidine in eggs by liquid chromatography with UV spectrophotometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 539, n. 1-2, p.31-34, 2005.

DRAISCI, R.; GIANNETTI, L.; LUCENTINI, L.; PALLESCHI, L.; BRAMBILLA, G.; SERPE, L.; GALLO, P. Determination of nitrofurans residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 777, n. 1, p.201-211, 1997.

DUBOIS, M.; FLUCHARD, D.; SIOR, E.; DELAHAUT, P. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 753, n. 2, p.189-202, 2001.

DUBOIS, M.; PIERRET, G.; DELAHAUT, P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 813, n. 1-2, p.181-189, 2004.

DUBREIL-CHENEAU, E.; BESSIRAL, M.; ROUDAUT, B.; VERDON, E.; SANDERS, P. Validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for 10 anticoccidials in eggs according to Commission Decision 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p.8149-8157, 2009.

DURDEN, D. A.; MACPHERSON, T. Quantitation and validation of fluoroquinolones in eggs using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 90, n. 2, p.613-625, 2007.

EC. Food and Veterinary Office. Inspection reports. Period 11 to 12/2005, Brazil. Control of residues and contaminants in live animals and animal products, including controls on veterinary medicinal products. Inspection number 7712/2005, 2005. Disponível em:<[http://ec.europa.eu/food/fvo/act\\_getPDF.cfm?PDF\\_ID=5189](http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=5189)> Acesso em:02/07/2015.

EC. Food and Veterinary Office. Inspection reports. Period 05/2013, Brazil. Control of residues and contaminants in live animals and animal products, including controls on veterinary medicinal products. Inspection number 2013-6850, 2014. Disponível em:<[http://ec.europa.eu/food/fvo/act\\_getPDF.cfm?PDF\\_ID=10862](http://ec.europa.eu/food/fvo/act_getPDF.cfm?PDF_ID=10862)> Acesso em:02/07/2015.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.;BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 44, n. 3, p.210-230, 2009.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Codex Alimentarius Commission. Recommended International Code of Practice for Control of the Use of Veterinary Drugs **[CAC/RCP 38, 1993]**. Geneva: FAO/WHO; 1993, 1993.

FDA. Code of Federal Regulations. Title 21-Food and drugs. Chapter I-Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Subchapter E-Animal drugs, feeds and related products. Part 556-Tolerances for residues of new animal drugs in food, 2014. Disponível em:<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?cfrpart=556>> Acesso em:10/07/2015.

FIGUEIREDO, T. C.; CANÇADO, S. V.; VIEGAS, R. P.; RÊGO, I. O. P.; LARA, L. J. C.; SOUZA, M. R.; BAIÃO, N. C. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 3, p.712-720, 2011.

FINZI, J. K.; DONATO, J. L.; SUCUPIRA, M.; DE NUCCI, G. Determination of nitrofurantoin metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 824, n. 1-2, p.30-35, 2005.

FORTI, A. F.; SCORTICHINI, G. Determination of ten sulphonamides in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 637, n. 1-2, p.214-219, 2009.

- FRENICH, A. G.; AGUILERA-LUIZ, M. D.; VIDAL, J. L. M.; ROMERO-GONZALEZ, R. Comparison of several extraction techniques for multiclass analysis of veterinary drugs in eggs using ultra-high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 661, n. 2, p.150-160, 2010.
- FURUSAWA, N. Determination of sulfonamide residues in eggs by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 4, p.848-52, 2002.
- FURUSAWA, N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. **Analytica Chimica Acta**, v. 481, n. 2, p.255-259, 2003.
- GAJDA, A.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J.; GBYLIK, M.; BLADEK, T. Determination of (fluoro)quinolones in eggs by liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p.430-439, 2012.
- GALARINI, R.; FIORONI, L.; MORETTI, S.; PETTINACCI, L.; DUSI, G. Development and validation of a multi-residue liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory method for eleven coccidiostats in eggs. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, n. 1-2, p.167-176, 2011.
- GIANNETTI, L.; GIORGI, A.; NECCI, F.; FERRETTI, G.; BUIARELLI, F.; NERI, B. Validation study on avermectine residues in foodstuffs. **Analytica Chimica Acta**, v. 700, n. 1-2, p.11-15, 2011.
- GIGOSOS, P. G.; REVESADO, P. R.; CADAHIA, O.; FENTE, C. A.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 871, n. 1-2, p.31-36, 2000.
- GIL, E. S.; BATISTA FILHO, R. O. P. Validação de Processos. In: E. S. GIL. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 2. São Paulo: Pharmabooks, 2007. p. 47-52.
- GRIMALT, S.; POZO, O. J.; MARIN, J. M.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F. Evaluation of different quantitative approaches for the determination of noneasily ionizable molecules by different atmospheric pressure interfaces used in liquid chromatography tandem mass spectrometry: abamectin as case of study. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, n. 10, p.1619-30, 2005.
- HAMSCHER, G.; LIMSUWAN, S.; TANSAKUL, N.; KIETZMANN, M. Quantitative analysis of tylosin in eggs by high performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry: Residue depletion kinetics after administration via feed and drinking water in laying hens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 24, p.9017-9023, 2006.

HASSOUAN, M. K.; BALLESTEROS, O.; TAOUFIKI, J.; VILCHEZ, J. L.; CABRERA-AGUILERA, A.; NAVALON, A. Multiresidue determination of quinolone antibacterials in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 852, n. 1-2, p.625-630, 2007.

HELLER, D. N.; NGOH, M. A.; DONOGHUE, D.; PODHORNIAK, L.; RIGHTER, H.; THOMAS, M. H. Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 1, p.39-52, 2002.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: silica SPE cleanup and LC-MS/MS analysis of ionophore and macrolide residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 23, p.6848-6856, 2004.

HELLER, D. N.; NOCHETTO, C. B.; RUMMEL, N. G.; THOMAS, M. H. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p.5267-5278, 2006.

HERRANZ, S.; MORENO-BONDI, M. C.; MARAZUELA, M. D. Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs. **Journal of Chromatography A**, v. 1140, n. 1-2, p.63-70, 2007.

HORMAZABAL, V.; YNDESTAD, M. Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in chicken tissues, plasma, and egg using liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, n. 10, p.1585-1598, 2000.

HORMAZABAL, V.; YNDESTAD, M.; OSTENSVIK, O. Determination of amprolium, ethopabate, lasalocid, monensin, narasin, and salinomycin in feed by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 25, n. 17, p.2655-2663, 2002.

HORMAZABAL, V.; YNDESTAD, M.; OSTENSVIK, O. Determination of Flunixin and Tiamulin Hydrogen Fumarate in Meat and Toltrazuril and the Metabolite Toltrazurilsulfon in Meat and Eggs Using LC/MS. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 26, n. 5, p.791-801, 2003.

HU, X. Z.; WANG, J. X.; FENG, Y. Q. Determination of benzimidazole residues in edible animal food by polymer monolith microextraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 1, p.112-119, 2010.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Aquisição Alimentar Domiciliar Per Capita. Brasil e Grandes Regiões. 2010.** Disponível em:<[http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/pof/Aquisicao%20alimentar%20domiciliar%20per%20capita\\_2008\\_2009.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/pof/Aquisicao%20alimentar%20domiciliar%20per%20capita_2008_2009.pdf)> Acesso em:14/09/2011.

INMETRO. **DQO–CGCRE–008: orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. 2003.** Disponível em:<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)> Acesso em:16/09/2011.

JIA, X.; SHAO, B.; WU, Y.; YANG, Y.; ZHANG, J. Simultaneous determination of tetracyclines and quinolones antibiotics in egg by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 2, p.461-468, 2008.

JIMENEZ, V.; COMPANYO, R.; GUITERAS, J. Validation of a method for the analysis of nine quinolones in eggs by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection. **Talanta**, v. 85, n. 1, p.596-606, 2011.

JIMENEZ, V.; RUBIES, A.; CENTRICH, F.; COMPANYO, R.; GUITERAS, J. Development and validation of a multiclass method for the analysis of antibiotic residues in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 11, p.1443-1451, 2011.

JING, T.; NIU, J.; XIA, H.; DAI, Q.; ZHENG, H.; HAO, Q.; MEI, S.; ZHOU, Y. Online coupling of molecularly imprinted solid-phase extraction to HPLC for determination of trace tetracycline antibiotic residues in egg samples. **Journal of Separation Science**, v. 34, n. 12, p.1469-1476, 2011.

KAN, C. A.; PETZ, M. Residues of veterinary drugs in eggs and their distribution between yolk and white. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 12, p.6397-6403, 2000.

KENNEDY, D. G.; MCCracken, R. J.; CANNAVAN, A.; HEWITT, S. A. Use of liquid chromatography–mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. **Journal of Chromatography A**, v. 812, n. 1–2, p.77-98, 1998.

KIM, E.; BAHN, K.; KANG, E.; KIM, M. Quantitative analysis of lincomycin and narasin in poultry, milk and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p.1063-1070, 2012.

LEE, J. H.; PARK, S.; JEONG, W. Y.; PARK, H. J.; KIM, H. G.; LEE, S. J.; SHIM, J. H.; KIM, S. T.; ABD EL-ATY, A. M.; IM, M. H.; CHOI, O. J.; SHIN, S. C. Simultaneous determination of phoxim and its photo-transformation metabolite residues in eggs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 1, p.64-70, 2010.

LOLO, M.; PEDREIRA, S.; FENTE, C.; VAZQUEZ, B. I.; FRANCO, C. M.; CEPEDA, A. Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p.2849-2852, 2005.

LU, Y.; SHEN, Q.; DAI, Z.; ZHANG, H. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbent for the ultra-fast determination of chloramphenicol in egg, honey, and milk by fused-core C18-based high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 4, p.1819-1826, 2010.

MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I.; SUMAR, S. The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. **Food Chemistry**, v. 75, n. 3, p.345-354, 2001.

MATABUDUL, D. K.; CONWAY, B.; LUMLEY, I. D. A rapid method for the determination of lasalocid in animal tissues and eggs by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and confirmation by LC-MS-MS. **Analyst**, v. 125, n. 12, p.2196-2200, 2000.

MATABUDUL, D. K.; CROSBY, N. T.; SUMAR, S. A new and rapid method for the determination of nicarbazin residues in poultry feed, eggs and muscle tissue using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, n. 4, p.499-502, 1999.

MATABUDUL, D. K.; LUMLEY, I. D.; POINTS, J. S. The determination of 5 anticoccidial drugs (nicarbazin, lasalocid, monensin, salinomycin and narasin) in animal livers and eggs by liquid chromatography linked with tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). **Analyst**, v. 127, n. 6, p.760-768, 2002.

MAXWELL, R. J.; COHEN, E.; DONOGHUE, D. J. Determination of sarafloxacin residues in fortified and incurred eggs using on-line microdialysis and HPLC/programmable fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 4, p.1563-1567, 1999.

MEHTABUDDIN; MIAN, A. A.; AHMAD, T.; NADEEM, S.; TANVEER, Z. I.; ARSHAD, J. Sulfonamide residues determination in commercial poultry meat and eggs. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p.473-478, 2012.

MITROWSKA, K.; POSYNIK, A.; ZMUDZKI, J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p.1273-1280, 2010.

MOL, H. G. J.; PLAZA-BOLANOS, P.; ZOMER, P.; DE RIJK, T. C.; STOLKER, A. A. M.; MULDER, P. P. J. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 24, p.9450-9459, 2008.



- MOLONEY, M.; CLARKE, L.; O'MAHONY, J.; GADAJ, A.; O'KENNEDY, R.; DANAHER, M. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1253, n., p.94-104, 2012.
- MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; DELAHAUT, P. Simultaneous detection of five coccidiostats in eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, n. 1-2, p.27-37, 2003.
- MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; HUET, A. C.; DELAHAUT, P.; VAN PETEGHEM, C. Determination of halofuginone in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after cleanup with immunoaffinity chromatography. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 16, p.1817-1820, 2004.
- MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; VAN PETEGHEM, C. Determination of the ionophoric coccidiostats narasin, monensin/lasalocid and salinomycin in eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, n. 4, p.533-539, 2005a.
- MORTIER, L.; DAESELEIRE, E.; VAN PETEGHEM, C. Liquid chromatographic tandem mass spectrometric determination of five coccidiostats in poultry eggs and feed. **Journal of Chromatography B**, v. 820, n. 2, p.261-270, 2005b.
- MOTTIER, P.; HURE, I.; GREMAUD, E.; GUY, P. A. Analysis of four 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxylated metabolites in egg, processed egg, and chicken meat by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p.2018-2026, 2006.
- NAGATA, T.; SAEKI, M.; IIDA, T.; KATAOKA, M.; SHIKANO, S. High performance liquid chromatographic determination of trimethoprim residues in egg yolk and albumen in a feeding experiment. **British Veterinary Journal**, v. 147, n. 4, p.346-351, 1991.
- NAKAJIMA, T.; NAGANO, C.; SASAMOTO, T.; HAYASHI, H.; KANDA, M.; KANAI, S.; TAKEBA, K.; MATSUSHIMA, Y.; TAKANO, I. Development and validation of rapid analysis method for multi-class veterinary drugs in livestock products by LC-MS/MS. **Food Hygiene and Safety Science**, v. 53, n. 5, p.243-253, 2012.
- NAKAZAWA, H.; INO, S.; KATO, K.; WATANABE, T.; ITO, Y.; OKA, H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 732, n. 1, p.55-64, 1999.
- NASR, J. J.; SHALAN, S.; BELAL, F. Determination of Ethopabate Residues in Chicken Muscles, Liver, and Eggs after Aqueous SDS Extraction by Micellar Liquid Chromatography with Fluorescence Detection with Application to Baby Food. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 6, p.1522-1528, 2013.

- NIKOLAIDOU, K. I.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotics Residues in Chicken Muscle and Egg Yolk According to 2002/657/EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 31, n. 14, p.2141-2158, 2008.
- OKA, H.; IKAI, Y.; KAWAMURA, N.; YAMADA, M.; HARADA, K.; ITO, S.; SUZUKI, M. Photodecomposition Products of Tetracycline in Aqueous Solution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n. 1, p.226-231, 1989.
- PACHECO-SILVA, E.; DE SOUZA, J. R.; CALDAS, E. D. Veterinary Drug Residues in Milk and Eggs. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p.111-122, 2014.
- PAMVET-PR. **Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná**. Disponível em:<<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/relatorio%20avicultura.pdf>> Acesso em:15/09/2011.
- PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. S.; REYES, F. G. R. Validation of chromatographic methods for the determination of residues of veterinary drugs in foods. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p.1190-1198, 2008.
- PENNEY, L.; SMITH, A.; COATES, B.; WIJEWICKREME, A. Determination of chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues by liquid chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 2, p.645-653, 2005.
- PETERS, R. J. B.; BOLCK, Y. J. C.; RUTGERS, P.; STOLKER, A. A. M.; NIELEN, M. W. F. Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p.8206-8216, 2009.
- RAMBLA-ALEGRE, M.; COLLADO-SANCHEZ, M. A.; ESTEVE-ROMERO, J.; CARDA-BROCH, S. Quinolones control in milk and eggs samples by liquid chromatography using a surfactant-mediated mobile phase. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p.1303-1313, 2011.
- ROBERT, C.; GILLARD, N.; BRASSEUR, P. Y.; PIERRET, G.; RALET, N.; DUBOIS, M.; DELAHAUT, P. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. **Food Additives and Contaminants**, v. 30, n. 3, p.443-457, 2013.
- ROKKA, M.; PELTONEN, K. Simultaneous determination of four coccidiostats in eggs and broiler meat: validation of an LC-MS/MS method. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 5, p.470-478, 2006.
- RONNING, H. T.; EINARSEN, K.; ASP, T. N. Determination of chloramphenicol residues in meat, seafood, egg, honey, milk, plasma and urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, and the validation of the method based on 2002/657/EC. **Journal of Chromatography A**, v. 1118, n. 2, p.226-233, 2006.



## REFERÊNCIAS

---

ROSE, M. D.; BYGRAVE, J.; STUBBINGS, G. W. F. Extension of multi-residue methodology to include the determination of quinolones in food. **Analyst**, v. 123, n. 12, p.2789-2796, 1998.

ROSEN, J. Efficient and sensitive screening and confirmation of residues of selected polyether ionophore antibiotics in liver and eggs by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Analyst**, v. 126, n. 11, p.1990-1995, 2001.

SAMS, M. J.; STRUTT, P. R.; BARNES, K. A.; DAMANT, A. P.; ROSE, M. D. Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Analyst**, v. 123, n. 12, p.2545-2549, 1998.

SCHNEIDER, M. J.; DONOGHUE, D. J. Multiresidue determination of fluoroquinolones in eggs. **Journal of AOAC International**, v. 83, n. 6, p.1306-1312, 2000.

SCHNEIDER, M. J.; DONOGHUE, D. J. Multiresidue determination of fluoroquinolone antibiotics in eggs using liquid chromatography-fluorescence-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 483, n. 1, p.39-49, 2003.

SCZESNY, S.; NAU, H.; HAMSCHER, G. Residue analysis of Tetracyclines and their metabolites in eggs and in the environment by HPLC coupled with a microbiological assay and tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 3, p.697-703, 2003.

SEAB. **Análise de conjuntura agropecuária - Avicultura de postura**. DEPARTAMENTO DE ECONOMIA RURAL. 2013. Disponível em: [http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/avicultura\\_postura\\_2012\\_13.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/avicultura_postura_2012_13.pdf) Acesso em: 05/04/2015.

SHAIKH, B.; RUMMEL, N.; DONOGHUE, D. Determination of sulfamethazine and its major metabolites in egg albumin and egg yolk by high performance liquid chromatography. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 22, n. 17, p.2651-2662, 1999.

SHAO, B.; WU, X.; ZHANG, J.; DUAN, H.; CHU, X.; WU, Y. Development of a Rapid LC-MS-MS Method for Multi-Class Determination of 14 Coccidiostat Residues in Eggs and Chicken. **Chromatographia**, v. 69, n. 9, p.1083-1088, 2009.

SHEN, J. Z.; LI, H. Y.; JIANG, H. Y.; ZHOU, D. G.; XU, F.; LI, J. C.; DING, S. Y. Simultaneous Determination of 13 Quinolones in Eggs Using Column High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry and Depletion of Pefloxacin Methanesulfonate in Eggs. **Journal of AOAC International**, v. 91, n. 6, p.1499-1506, 2008.

SHIM, J. H.; LEE, M. H.; KIM, M. R.; LEE, C. J.; KIM, I. S. Simultaneous measurement of fluoroquinolones in eggs by a combination of supercritical fluid extraction and high pressure liquid chromatography. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 67, n. 6, p.1342-1348, 2003.

SIQUEIRA, S. R. R.; DONATO, J. L.; DE NUCCI, G.; REYES, F. G. R. A high-throughput method for determining chloramphenicol residues in poultry, egg, shrimp, fish, swine and bovine using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 23-24, p.4012-4019, 2009.

SNA-NEWS. **Exportações de ovos crescem 112% em dezembro de 2014**. Disponível em:<<http://sna.agr.br/exportacoes-de-ovos-crescem-112-em-dezembro-de-2014/>> Acesso em:09/07/2015.

SOEBORG, T.; INGERSLEV, F.; HALLING-SORENSEN, B. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. **Chemosphere**, v. 57, n. 10, p.1515-24, 2004.

SPISSO, B. F.; FERREIRA, R. G.; PEREIRA, M. U.; MONTEIRO, M. A.; CRUZ, T. A.; DA COSTA, R. P.; LIMA, A. M. B.; DA NOBREGA, A. W. Simultaneous determination of polyether ionophores, macrolides and lincosamides in hen eggs by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry using a simple solvent extraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 682, n. 1-2, p.82-92, 2010.

SPISSO, B. F.; NÓBREGA, A. W.; MARQUES, M. A. S. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p.2091-2106, 2009.

STASTNY, K.; FRGALOVA, K.; HERA, A.; VASS, M.; FRANEK, M. In-house validation of liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of semicarbazide in eggs and stability of analyte in matrix. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 46, p.8187-8191, 2009.

STEFANELLO, C. Análise do sistema agroindustrial de ovos comerciais **Revista Agrarian**, v. 4, n. 14, p.375-382, 2011.

STOILLOVA, N. A.; SURLEVA, A. R.; STOEV, G. Simultaneous Determination of Nine Quinolones in Food by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. **Food Analytical Methods**, v. 6, n. 3, p.803-813, 2013.

SUMMA, S.; LO MAGRO, S.; ARMENTANO, A.; MUSCARELLA, M. Development and validation of an HPLC/DAD method for the determination of 13 sulphonamides in eggs. **Food Chemistry**, v. 187, n., p.477-484, 2015.

SZILAGYI, S.; DE LA CALLE, B. Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, n. 1, p.113-120, 2006.

TAKEDA, N.; GOTOH, M.; MATSUOKA, T. Rapid screening method for quinolone residues in livestock and fishery products using immobilised metal chelate affinity chromatographic clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. **Food Additives and Contaminants**, v. 28, n. 9, p.1168-1174, 2011.

TAMOSIUNAS, V.; PADARAUSKAS, A. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of sulfonamides in eggs. **Chemija**, v. 18, n. 3, p.20-24, 2007.

TAO, Y. F.; CHEN, D. M.; YU, H.; HUANG, L. L.; LIU, Z. Y.; CAO, X. Q.; YAN, C. X.; PAN, Y. H.; LIU, Z. L.; YUAN, Z. H. Simultaneous determination of 15 aminoglycoside(s) residues in animal derived foods by automated solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p.676-683, 2012.

TOLGYESI, A.; FEKETE, J.; FEKETE, S.; SHARMA, V. K.; BEKESI, K.; TOTH, E. Analysis of Sub ug/kg Lincomycin in Honey, Muscle, Milk, and Eggs Using Fast Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 3, p.190-198, 2012.

TOLGYESI, A.; SHARMA, V. K.; FEKETE, S.; FEKETE, J.; SIMON, A.; FARKAS, S. Development of a rapid method for the determination and confirmation of nitroimidazoles in six matrices by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 64-65, n., p.40-48, 2012.

TOLIKA, E. P.; SAMANIDOU, V. F.; PAPADOYANNIS, I. N. Development and validation of an HPLC method for the simultaneous determination of ten sulfonamide residues in whole egg according to 2002/657/EC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 34, n. 19, p.2396-2410, 2011.

VERDON, E.; COUEDOR, P.; ROUDAUT, B.; SANDERS, P. Multiresidue method for simultaneous determination of ten quinolone antibacterial residues in multimatrix/multispecies animal tissues by liquid chromatography with fluorescence detection: Single laboratory validation study. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p.1179-1192, 2005.

WANG, J.; LEUNG, D. Analyses of macrolide antibiotic residues in eggs, raw milk, and honey using both ultra-performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 19, p.3213-3222, 2007.

WANG, J.; LEUNG, D.; BUTTERWORTH, F. Determination of five macrolide antibiotic residues in eggs using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p.1857-1865, 2005.

WATERS. **Oasis solid-phase extraction products: simplifying solid-phase extraction.** Disponível em:<<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001692en.pdf>> Acesso em:09/07/2015.

XIA, X.; LI, X.; SHEN, J.; ZHANG, S.; DING, S.; JIANG, H. Determination of four nitroimidazoles in poultry and swine muscle and eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v. 89, n. 1, p.94-99, 2006.

XIE, K. Z.; JIA, L. F.; XU, D.; GUO, H. S.; XIE, X.; HUANG, Y. P.; CHEN, X. S.; BAO, W. B.; DAI, G. J.; WANG, J. Y. Simultaneous Determination of Amoxicillin and Ampicillin in Eggs by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection using Pre-Column Derivatization. **Journal of Chromatographic Science**, v. 50, n. 7, p.620-624, 2012.

XIE, K. Z.; JIA, L. F.; YAO, Y. L.; XU, D.; CHEN, S. Q.; XIE, X.; PEI, Y.; BAO, W. B.; DAI, G. J.; WANG, J. Y.; LIU, Z. P. Simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol and florfenicol amine in eggs by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 23, p.2351-2354, 2011.

YAKKUNDI, S.; CANNAVAN, A.; ELLIOTT, C. T.; LOVGREN, T.; KENNEDY, D. G. Development and validation of a method for the confirmation of nicarbazin in chicken liver and eggs using LC-electrospray MS-MS according to the revised EU criteria for veterinary drug residue analysis. **Analyst**, v. 126, n. 11, p.1985-1989, 2001.

ZENG, Z. L.; DONG, A. G.; YANG, G. X.; CHEN, Z. L.; HUANG, X. H. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B**, v. 821, n. 2, p.202-209, 2005.

ZENG, Z. L.; LIU, R.; ZHANG, J. H.; YU, J. X.; HE, L. M.; SHEN, X. G. Determination of Seven Free Anabolic Steroid Residues in Eggs by High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 3, p.229-236, 2013.

ZOTOU, A.; VASILIOU, C. LC of sulfonamide residues in poultry muscle and eggs extracts using fluorescence pre-column derivatization and monolithic silica column. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 1, p.11-22, 2010.

ZURHELLE, G.; MULLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Automated residue analysis of tetracyclines and their metabolites in whole egg, egg white, egg yolk and hen's plasma utilizing a modified ASTED system. **Journal of Chromatography B**, v. 739, n. 1, p.191-203, 2000.

---

# **ANEXOS**

---

---

# **ANEXO 1**

---

ANEXO 1 – MÉTODOS POR HPLC-UV e HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continua)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Trimetoprim	Coluna Nucleosil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 50 °C; Fase móvel: acetonitrila/ ácido acético/água (10:1:90 v/v/v); Modo isocrático; Detecção: 270 nm.	Extrair com acetonitrila. Aplicar o sobrenadante na coluna de alumina. Eluir com acetonitrila/água (90:10 v/v). Adicionar álcool propílico. Evaporar o solvente. Dissolver com acetonitrila. Filtrar.	LD: 0,02 ppm	NAGATA <i>et al.</i> , 1991
Nitrofuranos	Coluna Spherisorb ODS2 S5 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: água contendo acetato de sódio 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4,6/acetonitrila (79:21 v/v); Modo isocrático; Detecção: 362 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio (10% p/v) e diclorometano. Coletar a fase orgânica e evaporar. Redissolver com metanol/acetato de sódio 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4,6/acetonitrila (50:40:10 v/v/v). Adicionar hexano. Descartar a fração hexano. Analisar.	LD: 2,5-5,0 µg kg <sup>-1</sup>	DRAISCI <i>et al.</i> , 1997
Nitroimidazóis	Coluna Genesis C18 (250 x 3 mm; 4 µm); Fase móvel: acetonitrila/tampão de dihidrogenofosfato de potássio 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 4 (10:90 v/v); Modo isocrático; Detecção: 315 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar sulfato de sódio. Centrifugar. Filtrar (sulfato de sódio em papel de filtro). Adicionar ácido acético. Extração em fase sólida (Bond Elut SCX). Lavar com acetona, metanol e acetonitrila. Eluir com acetonitrila/amônia a 35% (95:5 v/v). Adicionar etilenoglicol/metanol (1:99 v/v). Evaporar o solvente. Dissolver com dihidrogenofosfato de potássio 0,25 mol L <sup>-1</sup> .	LD: 0,5 µg kg <sup>-1</sup>	SAMS <i>et al.</i> , 1998
Tetraciclinas	Coluna PLRP-S (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) tampão de dihidrogenofosfato de potássio 0,10 mol L <sup>-1</sup> / ácido cítrico 0,01 mol L <sup>-1</sup> /EDTA 0,01 mol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila/ metanol/tampão (25:10:65 v/v/v) Modo gradiente; Detecção: 350 nm.	Extrair com acetato de etila. Adicionar sulfato de sódio anidro. Filtrar (papel de filtro). Evaporar o solvente. Reconstituir com metanol. Filtrar.	LD: < 10 µg kg <sup>-1</sup>	COOPER <i>et al.</i> , 1998

ANEXO 1 – MÉTODOS POR HPLC-UV e HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Tetraciclinas	Coluna PLRP-S (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) solução tampão contendo ácido fosfórico 0,02 mol L <sup>-1</sup> com 1-decano-sulfonato de sódio 0,01 mol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: 355 nm.	Hidrólise com ácido clorídrico 1 mol L <sup>-1</sup> . Extrair com acetonitrila. Filtrar (lã de vidro). Extração líquido-líquido com diclorometano e éter de petróleo. Evaporar parcialmente a fração inferior. Adicionar ácido clorídrico 0,01 mol L <sup>-1</sup> . Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com ácido clorídrico 0,01 mol L <sup>-1</sup> . Filtrar (celulose regenerada). Analisar.	LD: 2,2-28,6 ng g <sup>-1</sup> LQ: 13,0-51,6 ng g <sup>-1</sup>	DE RUYCK <i>et al.</i> , 1999
Coccidiostáticos	Coluna APEX ODS (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água (55:45 v/v); Modo isocrático; Detecção: 344 nm.	Misturar com sulfato de sódio anidro e alumina. Extração com fluido supercrítico (85 °C, 4000 psi), temperatura do restritor 100 °C e fluxo de CO <sub>2</sub> de 2 mL min <sup>-1</sup> . Diluir o extrato com metanol. Filtrar.	Não relatado	MATABUDUL; CROSBY; SUMAR, 1999
Sulfonamidas	Coluna LiChrosorb RP Select B (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) tampão fosfato 0,01 mol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente; Detecção: 268 nm.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Dissolver com fase móvel. Analisar diretamente o extrato da clara. Ao extrato da gema, adicionar hexano. Descartar a fração hexano. Adicionar cloreto de sódio. Centrifugar. Analisar.	Não relatado	SHAIKH; RUMMEL; DONOGHUE, 1999
Quinolonas	Coluna C18 Hypersil BDS (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: ácido ortofosfórico 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,5/acetonitrila (85:15 v/v); Modo isocrático; Detecção: 280 nm.	Extrair com ácido clorídrico 1 mol L <sup>-1</sup> . Extração em fase sólida (Sep-Pak C18). Lavar com água. Eluir com fosfato monopotássico 1 mol L <sup>-1</sup> , pH 2,5/metanol (1:1 v/v). Evaporar parcialmente o solvente. Analisar.	LD: 1-4 ng	GIGOSOS <i>et al.</i> , 2000



ANEXO 1 – MÉTODOS POR HPLC-UV e HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Tetraciclinas	Coluna Supersphere RP-8 (250 x 3 mm; 4 µm); Fase móvel 1: acetonitrila/ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> (50:50 v/v); Fase móvel 2: acetonitrila/ácido oxálico 0,005 mol L <sup>-1</sup> (50:50 v/v); Modo isocrático; Detecção: 360 ou 310 nm.	Homogeneizar e diluir com tampão citrato de sódio 0,3 mol L <sup>-1</sup> , pH 5,75. Limpar por diálise e extração em fase sólida (PLRP-S) utilizando um sistema ASTED ( <i>automated trace enrichment of dialysates</i> ). Analisar.	LD: 11-15 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 35-45 µg kg <sup>-1</sup>	ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000
Sulfonamidas	Coluna Mightysil RP-4 GP (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: etanol/água (28:72 v/v); Modo isocrático; Detecção: 269 nm.	Extrair com etanol/água (50:50 v/v). Centrifugar (Ultrafree-MC/PL). Analisar.	LD: 0,024-0,066 ppm LQ: 0,044-0,093 ppm	FURUSAWA, 2002
Sulfonamidas	Coluna Symmetry C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) 0,1% de ácido fórmico/metanol (90:10 v/v), (B) metanol e (C) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: 287 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar água e evaporar parcialmente o solvente. Extração em fase sólida (C18 Sep-Pak). Eluir com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente e diluir com água. Filtrar (PVDF). Analisar.	Não relatado	HELLER <i>et al.</i> , 2002
Sulfonamidas	Coluna Mightysil RP-4 GP (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: solução de ácido cítrico 0,18 mol L <sup>-1</sup> ; Modo isocrático; Detecção: 267 nm.	Extração com solução de ácido perclórico a 10% (v/v). Centrifugar (Ultrafree-MC/PL). Analisar.	LD: < 0,05 µg g <sup>-1</sup>	FURUSAWA, 2003

ANEXO 1 – MÉTODOS POR HPLC-UV e HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Coccidiostáticos	Coluna Novapak C18 (250 x 4,6 mm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: acetonitrila/ tampão fosfato de amônio 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 6,8 (65:35 v/v); Modo isocrático; Detecção: 317 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Dissolver com acetonitrila/água (65:35 v/v). Analisar.	CC $\alpha$ : 10 $\mu$ g kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 17 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	DOWLING; O'KEEFFE; SMYTH, 2005
Quinolonas	Coluna PerfectSil Target ODS-3 (250 x 4 mm; 5 $\mu$ m); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) 0,1% de TFA, (B) acetonitrila e (C) metanol; Modo gradiente; Detecção: 275 e 255 nm.	Extrair com acetonitrila contendo hidróxido de sódio 0,75 mol L <sup>-1</sup> . Evaporar o solvente. Dissolver com ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1%. Extração em fase sólida (LiChrolut Merck RP-18). Eluir com acetonitrila contendo 0,1% de TFA e em seguida acetonitrila. Evaporar o solvente. Dissolver com solução aquosa de TFA a 0,1%. Analisar.	Gema LD: 8 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	CHRISTODOULOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2007
Tetraciclinas	Coluna Kromasil C18 (250 x 4 mm; 5 $\mu$ m); Fase móvel: (A) solução de ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: 355 nm.	Extrair com solução de ácido trifluoroacético a 40%. Adicionar tampão oxalato 0,4 mol L <sup>-1</sup> , pH 4. Filtrar. Extração em fase sólida (Nexus). Eluir com metanol/acetonitrila/ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> (30:30:40 v/v/v). Evaporar o solvente. Reconstituir com metanol. Analisar.	CC $\alpha$ : 206,53-214,60 $\mu$ g kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 216,21-228,97 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>	NIKOLAIDOU; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2008
Sulfonamidas Trimetoprim	Coluna Octadecil Luna (150 x 4,6 mm; 10 $\mu$ m); Fase móvel: (A) água contendo 50 mmol L <sup>-1</sup> de TFA e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: 240 e 269 nm.	Extrair com acetonitrila. Centrifugar. Analisar.	LQ: 80 ng mL <sup>-1</sup>	DE PAULA; DE PIETRO; CASS, 2008

ANEXO 1 – MÉTODOS POR HPLC-UV e HPLC-DAD PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (conclusão)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Tetraciclinas	Coluna Restek C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água acidificada com ácido clorídrico, pH 3; Modo gradiente; Detecção: 355 nm.	Misturar com sílica gel. Eluir com acetonitrila. Filtrar. Extração em fase sólida MIP ( <i>Molecularly Imprinted Polymer</i> ). Lavar com acetonitrila/ água (7:3 v/v). Eluir com fase móvel. Analisar.	LD: 0,8-1,3 ng g <sup>-1</sup> LQ: 2,6-4,3 ng g <sup>-1</sup>	JING <i>et al.</i> , 2011
Sulfonamidas	Coluna Kromasil C18 (250 x 4 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico, (B) acetonitrila e (C) metanol; Modo gradiente; Detecção: 265 nm.	Extraír com acetato de etila. Evaporar o solvente. Dissolver com água. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Eluir com metanol. Evaporar o solvente. Reconstituir com fase móvel. Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 0,6-3,3 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,8-9,8 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 101,74-108,42 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 106,84-119,01 µg kg <sup>-1</sup>	TOLIKA; SAMANIDOU; PAPADOYANNIS, 2011
Sulfonamidas	Coluna Teknokroma Mediterranea C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 35 °C; Fase móvel: dihidrogenofosfato de potássio 0,01 mol L <sup>-1</sup> /metanol (70:30 v/v); Modo isocrático; Detecção: 265 nm.	Extração líquido-líquido com fase móvel/ hexano (1:8 v/v). Centrifugar. Descartar a fração hexano. Adicionar cloreto de sódio à fração aquosa. Centrifugar. Filtrar (nylon e celulose regenerada). Analisar.	LD: 0,025 µg mL <sup>-1</sup>	MEHTABUDDIN <i>et al.</i> , 2012
Sulfonamidas	Coluna Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) tampão acetato 0,02 mol L <sup>-1</sup> e (B) metanol/acetonitrila (50:50 v/v), 85:15 v/v; Modo isocrático; Detecção: 270 nm.	Misturar com ácido acético a 10%. Acrescentar clorofórmio/acetona (50:50 v/v), misturar e sonicar. Acrescentar cloreto de sódio e sulfato de sódio. Transferir a fração orgânica para um tubo e adicionar ácido acético glacial. Extração em fase sólida (SCX Phenomenex). Eluir com metanol/amônia (97,5:2,5 v/v). Evaporar o solvente. Reconstituir com fase móvel. Acrescentar hexano. Misturar. Centrifugar. Analisar o extrato.	LD: 0,30-1,35 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,92-3,92 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 11,3-18,5 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 13,2-27,3 µg kg <sup>-1</sup>	SUMMA <i>et al.</i> , 2015

NOTA: LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CCα: limite de decisão e CCβ: capacidade de detecção.

---

## **ANEXO 2**

---

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continua)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Tetraciclinas	Coluna PLRP-S (250 x 4,6 mm; 8 µm) Fase móvel: (A) solução aquosa de ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 2 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/ emissão em 406/515 nm.	Misturar com tampão succinato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 4. Extrair com metanol. Filtrar (papel de filtro). Cromatografia de afinidade por metal quelato. Lavar com tampão succinato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> , água, metanol e água. Eluir com um tampão McIlvaine-EDTA cloreto de sódio. Aplicar sobre a membrana de extração SDB-RPS e lavar com ácido clorídrico 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Eluir com metanol/amônia a 25% (97:3 v/v). Evaporar o solvente. Reconstituir com solução aquosa de ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> . Analisar.	LD: 0,42-1,38 ng g <sup>-1</sup> LQ: 2-5 ng g <sup>-1</sup>	CROUBELS; VANOOSTHUYZE; VANPETEGHEM, 1997
Fluorquinolonas Quinolonas	Fluorquinolonas Coluna Zorbax RX C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: tampão fosfato 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 3/acetonitrila (80:20 v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 278/445 nm; Detecção UV de marbofloxacin em 302 nm.  Quinolonas ácidas Coluna Kromasil C8 (250 x 3,2 mm; 5 µm); Fase móvel: ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> / acetonitrila/metanol (6:3:1 v/v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 278/445 nm.	Fluoroquinolonas: Extrair com acetonitrila contendo 2% de ácido acético. Adicionar sulfato de sódio. Filtrar (sulfato de sódio). Extração em fase sólida (Bond Elut SCX). Lavar com acetona, metanol e acetonitrila. Eluir com metanol/amônia a 35% (95:5 v/v). Evaporar o solvente. Dissolver com fase móvel. Analisar.  Quinolonas ácidas: Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Redissolver com hidrogenofosfato dissódico 0,05 mol L <sup>-1</sup> (pH 11). Extração em fase sólida (resina AGMP-1). Lavar com água, metanol e acetonitrila. Eluir com metanol/ácido acético (95:5 v/v). Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> . Analisar.	LQ: 5-50 µg kg <sup>-1</sup>	ROSE; BYGRAVE; STUBBINGS, 1998

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Fluorquinolonas	Coluna Supelcosil-ABZ+Plus (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) tampão de ácido fosfórico 0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 2,7 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 278/440 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio 1 mol L <sup>-1</sup> . Centrifugar. Adicionar hexano e etanol. Centrifugar. Transferir a fase aquosa para um tubo de diálise. Limpar por microdiálise utilizando um sistema ASTED ( <i>automated trace enrichment of dialysates</i> ). Analisar.	LD: 0,2 ng g <sup>-1</sup> LQ: 1 ng g <sup>-1</sup>	MAXWELL; COHEN; DONOGHUE, 1999
Ionóforos	Coluna Luna Fenil Hexil (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/tampão acetato de amônio pH 4,5 (90:10 v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 310/430 nm.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Filtrar. Para analisar ao nível de concentração de 1-6 ng g <sup>-1</sup> , evaporar parcialmente o solvente e filtrar. Analisar.	Não relatado	MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000
Fluorquinolonas	Coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) ácido fosfórico 0,025 mol L <sup>-1</sup> , pH 2,8; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 278/440 nm.	Extrair com acetonitrila e hidróxido de amônio concentrado. Adicionar hexano, éter etílico e cloreto de sódio 1 mol L <sup>-1</sup> . Rejeitar a camada superior. Evaporar a camada inferior. Redissolver com tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 9. Filtrar (nylon). Analisar.	LQ: 0,3-3 µg kg <sup>-1</sup>	SCHNEIDER; DONOGHUE, 2000
Tetraciclinas	Coluna Supersphere RP-8 (250 x 3 mm; 4 µm); Fase móvel 1: acetonitrila/ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> (50:50 v/v) Fase móvel 2: acetonitrila/ácido oxálico 0,005 mol L <sup>-1</sup> (50:50 v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 350/420 nm.	Homogeneizar e diluir com tampão citrato de sódio 0,3 mol L <sup>-1</sup> , pH 5,75. Limpar por diálise e extração em fase sólida (PLRP-S) utilizando um sistema ASTED ( <i>automated trace enrichment of dialysates</i> ). Analisar.	LD: 11 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 34 µg kg <sup>-1</sup>	ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Fluorquinolonas	Coluna Zorbax Eclipse XDB-Fenil (150 x 3 mm; 3,5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) água contendo 1% de ácido fórmico pH 3 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 278/440 nm.	Extrair com acetonitrila e hidróxido de amônio concentrado. Adicionar hexano, éter etílico e cloreto de sódio 1 mol L <sup>-1</sup> . Rejeitar a camada superior. Evaporar a camada inferior. Redissolver com tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 9. Filtrar (nylon). Analisar.	LQ: 0,1-2 ng g <sup>-1</sup>	SCHNEIDER; DONOGHUE, 2003
Fluorquinolonas	Coluna Novapak C18 (300 x 3 mm; 4 µm) Fase móvel: metanol/trietilamina/ácido fosfórico 4 mmol L <sup>-1</sup> (25:5:70 v/v/v, pH 3,5); Modo isocrático; Detecção: excitação/ emissão em 290/450 nm.	Extração por fluido supercrítico com CO <sub>2</sub> supercrítico contendo 20% (v/v) de metanol. Analisar.	LD: 10 ppb	SHIM <i>et al.</i> , 2003
Quinolonas	Coluna Luna C18 (150 x 2 mm; 3,5 µm) Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 294/514; 328/425 e 312/366 nm.	Extrair com solução de ácido tricloroacético a 5%. Centrifugar. Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 4-11 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 13-36 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 44-235 pg kg <sup>-1</sup> CCβ: 57-306 pg kg <sup>-1</sup>	VERDON <i>et al.</i> , 2005
Fluorquinolonas	Coluna Hypersil-BDS (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 50 °C; Fase móvel: acetonitrila/ ácido cítrico 50 mmol L <sup>-1</sup> e acetato de amônio 100 mmol L <sup>-1</sup> , pH 4 (9:91 v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 278/ 465 nm.	Clara - Extrair com ácido acético/etanol absoluto (1:99 v/v). Gema - Extrair com acetonitrila e ácido acético/etanol absoluto (1:99 v/v). Centrifugar. Evaporar o sobrenadante. Dissolver com acetonitrila. Adicionar hexano. Descartar a fração hexano. Evaporar a fração restante. Dissolver com fase móvel. Centrifugar. Filtrar (nylon). Analisar.	LQ: 5-20 ng g <sup>-1</sup>	ZENG <i>et al.</i> , 2005

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Quinolonas	Coluna Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 35 °C; Fase móvel: (A) tampão citrato pH 4,5 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 280/450 e 325/365 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar diclorometano. Centrifugar. Descartar a fração diclorometano. Analisar.	LD: 4-12 ng g <sup>-1</sup>	HASSOUAN <i>et al.</i> , 2007
Fluorquinolonas	Coluna AQUA C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Fase móvel: (A) ácido ortofosfórico 25 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 280/440 nm.	Misturar com o agente de dispersão (areia de quartzo ou terra diatomácea). Colocar a mistura em células de extração de aço inoxidável, contendo filtros de fibra de vidro. Iniciar o programa de extração por líquido pressurizado (70 °C e 1500 psi). Extrair com fosfato 50 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3/ acetonitrila (50:50 v/v). Filtrar (fibra de vidro). Evaporar o solvente. Dissolver com fase móvel. Analisar.	CCα: 17-24 ng g <sup>-1</sup> CCβ: 30-41 ng g <sup>-1</sup>	HERRANZ; MORENO-BONDI; MARAZUELA, 2007
Quinolonas Fluorquinolonas	Coluna XBridge C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) tampão ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,5; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 290/495; 278/455 e 327/369 nm.	Extrair com 2,5% de ácido tricloroacético/ acetonitrila (25:75 v/v). Adicionar sulfato de sódio anidro. Centrifugar. Adicionar hexano. Rejeitar a fração hexano. Evaporar o solvente. Dissolver com ácido oxálico 0,01 mol L <sup>-1</sup> /acetonitrila (83:17 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 0,1-5 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,3-25 µg kg <sup>-1</sup>	CHO <i>et al.</i> , 2010



ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Sulfonamidas	Coluna Chromolith Performance RP-18 (100 x 4,6 mm); Fase móvel: (A) tampão acetato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,4 e (B) metanol; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 406/496 nm.	Extraír com acetonitrila e ácido fosfórico concentrado. Centrifugar. Evaporar parcialmente o solvente. Extração em fase sólida (Nexus Absolut). Lavar com água/metanol (95:5 v/v). Reconstituir com solução de putrescina a 10 mg L <sup>-1</sup> em tampão acetato 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 3,4. Filtrar. Analisar.	LD: 2-15 µg kg <sup>-1</sup>	ZOTOU; VASILIADOU, 2010
Avermectinas	Coluna Hypersil C18 (250 x 4 mm; 5 µm) Fase móvel: água/acetonitrila/metanol (5:35:60 v/v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 365/470 nm.	Extraír com acetonitrila. Adicionar hexano. Homogeneizar e descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Derivatizar com 1-metil-imidazol/acetonitrila (1:1 v/v), anidrido trifluoroacético/acetonitrila (1:2 v/v) e ácido acético. Aquecer a 70 °C durante 30 min. Analisar.	CCα: 2,1-4,3 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 2,9-5,0 µg kg <sup>-1</sup>	GIANNETTI <i>et al.</i> , 2011
Quinolonas	Coluna Inertsil C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Coluna Kinetex C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) ácido oxálico 0,01 mmol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 297/507; 280/458; 263/380 e 248/361 nm.	Misturar com terra diatomácea contendo EDTA. Colocar a mistura em célula de extração de aço inoxidável contendo filtro de celulose. Iniciar o programa de extração por líquido pressurizado (5 min, 70 °C e 1500 psi). Extraír e diluir com acetonitrila/tampão de ácido succínico 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 6 (1:1 v/v). Centrifugar. Evaporar o solvente. Redissolver com água. Filtrar (nylon). Analisar.	Inertsil Column  LD: 1-30 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,5-50 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 0,2-19,8 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,4-33,5 µg kg <sup>-1</sup>  Kinetex Column  LD: 1-75 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,5-100 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 0,2-15,3 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,4-30,7 µg kg <sup>-1</sup>	JIMENEZ; COMPANYO; GUITERAS, 2011

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Quinolonas	Coluna Kromasil C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 25 °C; Fase móvel: dodecil sulfato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> , 10% de butanol e 0,5% de trietilamina pH 3; Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 260/366 e 280/450 nm.	Misturar com dodecil sulfato de sódio 0,05 mol L <sup>-1</sup> , pH 3. Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 0,03-1,8 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,5-6 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 30,18-100,7 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 31,1-102,6 µg kg <sup>-1</sup>	RAMBLA-ALEGRE <i>et al.</i> , 2011
Quinolonas	Coluna Atlantis C18 (20 x 4,6 mm; 3 µm) Fase móvel: (A) metanol, (B) água e (C) ácido fórmico (15:85:0,1 v/v/v) para fluorquinolonas e (35:65:0,1 v/v/v) para quinolonas ácidas; Modo isocrático; Detecção: excitação/ emissão em 295/455 e 495 nm para fluorquinolonas e 320/365 nm para quinolonas ácidas.	Extraír com acetonitrila/metanol (1:1 v/v). Diluir com metanol. Extração em fase sólida (F3 + IMAC). Lavar com metanol e água. Eluir com um tampão McIlvaine-EDTA-cloreto de sódio. Analisar.	LQ: 0,8-6,5 µg kg <sup>-1</sup>	TAKEDA; GOTOH; MATSUOKA, 2011
Anfenicóis	Coluna LiChrospher C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) dihidrogenofosfato de sódio contendo dodecil sulfato de sódio 0,005 mol L <sup>-1</sup> , 0,1% de trietilamina pH 4,8 (A/B; 35:65 v/v); Modo isocrático; Detecção: excitação/emissão em 224/290 nm.	Extraír com acetonitrila/água (30:70 v/v). Adicionar acetato de etila/acetonitrila/ hidróxido de amônio (49:49:2 v/v/v). Centrifugar. Evaporar o sobrenadante. Reconstituir com acetonitrila. Adicionar hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Redissolver com fase móvel. Filtrar. Analisar.	LD: 0,5-1,5 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 2-5 µg kg <sup>-1</sup>	XIE <i>et al.</i> , 2011
Quinolonas Fluorquinolonas	Coluna Luna C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) ácido oxálico 0,02 mol L <sup>-1</sup> , pH 4; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 280/ 450 nm e 245/360 nm.	Extraír com acetonitrila. Adicionar solução de amônia a 25%. Centrifugar. Adicionar cloreto de sódio. Transferir a camada orgânica para um tubo de centrifuga contendo 100 mg de sorbente C18. Centrifugar. Evaporar. Analisar.	LD: 3-10 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 10-30 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 13-37 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 17-43 µg kg <sup>-1</sup>	GAJDA <i>et al.</i> , 2012

ANEXO 2 – MÉTODOS POR HPLC-FLU PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (conclusão)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Penicilinas	Coluna Athena C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) dihidrogenofosfato de potássio 0,01 mol L <sup>-1</sup> , pH 5,5 e (B) acetonitrila; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 354/ 445 nm.	Extrair com acetonitrila. Adicionar diclorometano. Centrifugar. Transferir o sobrenadante e adicionar salicilaldeído e ácido tricloroacético a 25%. Aquecer em um banho de água fervente (100 °C, 60 min). Resfriar a temperatura ambiente e diluir com acetonitrila/água (50:50 v/v). Centrifugar. Filtrar. Analisar.	LD: 0,4-1,2 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,5-3,9 µg kg <sup>-1</sup>	XIE <i>et al.</i> , 2012
Coccidiostáticos	Coluna Nucleodur MN-C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: dodecil sulfato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> , 10% de 1-propanol e 0,3% de trietilamina em ácido fosfórico 0,02 mol L <sup>-1</sup> , pH 4; Modo isocrático; Detecção: excitação/ emissão em 271/364 nm.	Misturar com dodecil sulfato de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 4. Centrifugar. Filtrar (celulose regenerada). Diluir com fase móvel. Analisar.	LD: 1,6 ng g <sup>-1</sup>	NASR; SHALAN; BELAL, 2013
Quinolonas	Coluna Zorbax Eclipse XDB C18 (150 x 3 mm; 5 µm); Termostato: 50 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico, (B) acetonitrila e (C) metanol; Modo gradiente; Detecção: excitação/emissão em 280/450 nm e 312/360 nm.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Dissolver com tampão acetato de amônio 20 mmol L <sup>-1</sup> , pH 9. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com água deionizada. Eluir com acetonitrila contendo 0,2% de ácido fórmico. Evaporar o solvente. Dissolver com solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%/acetonitrila (90:10 v/v). Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 3-50 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 7,5-100 µg kg <sup>-1</sup> CC $\alpha$ : 22,5-65,9 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 26,2-77,1 µg kg <sup>-1</sup>	STOILOVA; SURLEVA; STOEV, 2013

NOTA: LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CC $\alpha$ : limite de decisão e CC $\beta$ : capacidade de detecção.

---

## **ANEXO 3**

---

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continua)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Nitroimidazóis	LC-MS (Termospray – modo positivo) Coluna Partisil 5 ODS 3 (250 x 4 mm); Fase móvel: metanol/água (1:1 v/v) contendo 0,05 mol L <sup>-1</sup> de acetato de amônio; Modo isocrático.	Extrair com tolueno. Extração em fase sólida (coluna de sílica). Lavar com diclorometano e hexano. Eluir com acetona. Evaporar o solvente e dissolver em metanol/água (1:1 v/v). Lavar com hexano. Analisar.	LD: < 1 ng g <sup>-1</sup>	CANNAVAN; KENNEDY, 1997
Nitroimidazóis	LC-MS (APCI - modo positivo) Coluna Produgy ODS3 Column (250 x 3,2 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: acetonitrila/acetato de amônio 0,05 mol L <sup>-1</sup> (13:87 v/v); Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila e sulfato de sódio. Filtrar (sulfato de sódio em papel de filtro). Adicionar ácido acético ao filtrado. Extração em fase sólida (Bond Elut SCX). Lavar com acetona, metanol e acetonitrila. Eluir com acetonitrila/amônia a 35% (95:5 v/v). Adicionar etilenoglicol/metanol (1:99 v/v) e evaporar. Dissolver em fase móvel. Analisar.	LD: 0,1-0,5 µg kg <sup>-1</sup>	SAMS <i>et al.</i> , 1998
Tetraciclinas	LC-MS/MS (APCI - modo positivo) Coluna Bakerbond C8 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: metanol/acetonitrila/ácido oxálico 5 mmol L <sup>-1</sup> (18:27:55 v/v/v); Modo isocrático.	Extrair com EDTA dissódico 0,1 mol L <sup>-1</sup> / tampão McIlvaine (pH 4). Extração em fase sólida (Bond Elut ENV). Eluir com metanol. Evaporar o solvente. Dissolver em água/metanol (50:50 v/v). Analisar.	LD: 5-20 pg µL <sup>-1</sup>	NAKAZAWA <i>et al.</i> , 1999
Ionóforos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 Fenil Hexil (150 x 2,1 mm; 3 µm); Fase móvel: ácido trifluoracético/acetonitrila/metanol/tetrahidrofuran/água (0,1:67:10:10:13 v/v/v/v/v); Modo isocrático.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Filtrar. Para analisar ao nível de 1 a 6 ng g <sup>-1</sup> , evaporar parcialmente o solvente e filtrar. Analisar.	LQ: 1 ng g <sup>-1</sup>	MATABUDUL; CONWAY; LUMLEY, 2000

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Coccidiostáticos	<p>LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 Supelco Discovery (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: metanol/água contendo acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (85:15 v/v); Modo isocrático.</p> <p>LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Supelcosil LC-ABZ+Plus (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água contendo acetato de amônio 10 mmol L<sup>-1</sup> (35:65 v/v); Modo isocrático.</p> <p>LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Supelcosil LC-CN (150 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água contendo 10 mmol L<sup>-1</sup> de acetato de amônio (50:50 v/v); Modo isocrático.</p>	<p>Extrair com acetona/tetrahidrofurano (6:4 v/v). Extração líquido-líquido com éter dietílico/ hexano (6:4 v/v). Separar a camada orgânica da aquosa. Evaporar a camada orgânica e diluir com hexano. Dividir a fração hexano em duas partes, uma para analisar o etopabato (ETB) e a outra para analisar o lasalocid (LAS), monensina (MON), narasina (NAR), e a salinomycin (SAL). Análise do ETB: adicionar metanol/ácido 1-heptano sulfônico sódico 0,022 mol L<sup>-1</sup> e hidrogenofosfato dissódico-2-hidratado 0,01 mol L<sup>-1</sup> (70:30 v/v, pH 6,0). Limpar com hexano. Filtrar a fração metanol (filtro Spin-X). Análise do LAS, MON, NAR e SAL: extração em fase sólida (Sep-pak Vac RC). Eluir com diclorometano/metanol (90:10 v/v). Evaporar. Dissolver com metanol/água (8:2 v/v). Filtrar (filtro Spin-X). Análise do amprólio (AMP): adicionar acetona e diclorometano na camada aquosa. Ajustar o volume com água. Filtrar (filtro Spin-X). Analisar.</p>	<p>LD: ≤ 5 ng g<sup>-1</sup> LQ: ≤ 10 ng g<sup>-1</sup></p>	<p>HORMAZABAL; YNDESTAD; OSTENSVIK, 2002</p>
Tetraciclina	<p>LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Supersphere RP-8 (250 x 3 mm; 4 µm); Fase móvel: acetonitrila/água contendo 0,5% de ácido fórmico (40:60 v/v); Modo isocrático.</p>	<p>Homogeneizar e diluir com tampão citrato de sódio 0,3 mol L<sup>-1</sup> (pH 5,75). Limpar por diálise e extração em fase sólida (PLRP-S) utilizando um sistema ASTED (<i>automated trace enrichment of dialysates</i>). Analisar.</p>	<p>LD: 11-15 µg kg<sup>-1</sup> LQ: 34-45 µg kg<sup>-1</sup></p>	<p>ZURHELLE; MULLER-SEITZ; PETZ, 2000</p>

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Antiparasitários	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Alltima C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm) Fase móvel: (A) água contendo 0,04 mol L <sup>-1</sup> de acetato de amônio (pH 5,2) e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Homogeneizar a amostra e alcalinizar com hidróxido de sódio 0,1 mol L <sup>-1</sup> . Extrair com acetato de etila. Evaporar o solvente e dissolver em metanol. Remover a gordura com hexano. Descartar a fração hexano e diluir a fração restante com metanol. Filtrar (PTFE). Analisar.	LD: 0,14-1,14 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1-2 µg kg <sup>-1</sup>	DE RUYCK <i>et al.</i> , 2001
Macrolídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 Purospher (125 x 3 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água contendo 0,1 mL L <sup>-1</sup> de acetato de amônio; Modo gradiente.	Extrair com tampão Tris (pH 10,5) e precipitar as proteínas com ácido acético e tungstato de sódio. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com metanol/água (5:95 v/v) e hexano. Eluir com metanol/amônia a 30% (95:5 v/v). Evaporar o solvente e dissolver em acetato de amônio/acetonitrila (80:20 v/v). Centrifugar. Analisar.	LD: 0,01-37 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 20-200 µg kg <sup>-1</sup>	DUBOIS <i>et al.</i> , 2001
Ionóforos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 Fenil Hexil (150 x 2,1 mm; 3 µm); Fase móvel: ácido trifluoracético/acetonitrila/metanol/tetrahidro furano/água (0,1:67:10:10:13 v/v/v/v/v); Modo isocrático.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Extração em fase sólida (Isolute IST – sílica). Eluir com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar. Analisar.	LD: 1 ng mL <sup>-1</sup>	MATABUDUL <i>et al.</i> , 2001
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Genesis C18 (50 x 2,1 mm; 4 µm) Fase móvel: (A) água contendo 0,05 mol L <sup>-1</sup> de acetato de amônio e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Extrair com 87% de metanol. Extração em fase sólida (Isolute SPE MF C18). Lavar com 80% de metanol e eluir com metanol. Analisar.	LD: 0,04-0,12 ng mL <sup>-1</sup>	ROSEN, 2001

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água (75:25 v/v) contendo acetato de amônio 0,05 mol L <sup>-1</sup> ; Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente e redissolver em hexano. Adicionar metanol/água (75:25 v/v). Analisar a camada aquosa. Analisar.	CC $\alpha$ : 204,5-211,4 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 209,5-229,1 µg kg <sup>-1</sup>	YAKKUNDI <i>et al.</i> , 2001
Tetraciclina	LC-MS (ESI - modo positivo) Coluna Hypersil C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) água, ambos contendo ácido fórmico 10 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Extrair com água contendo 1 mmol L <sup>-1</sup> de EDTA dissódico. Filtrar (filtro de papel). Extração em fase sólida (Carbograph 4). Eluir com metanol seguido por diclorometano/ metanol (80:20 v/v), acidificado com ácido trifluoracético 10 mmol L <sup>-1</sup> . Evaporar parcialmente o solvente. Dissolver em água/metanol (80:20 v/v). Filtrar (Teflon). Analisar.	LQ: 2-19 ppb	BRUNO <i>et al.</i> , 2002
Sulfonamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna ODS-AQ, YMC C18 (50 x 4 mm; 3 µm); Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar água. Evaporar parcialmente o solvente. Extração em fase sólida (C18 Sep-Pak). Eluir com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com água. Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 5-10 ng g <sup>-1</sup>	HELLER <i>et al.</i> , 2002
Ionóforos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Luna C18 Fenil Hexil (150 x 2,1 mm; 3 µm); Fase móvel: ácido trifluoracético/acetonitrila/metanol/tetrahidrofurano/água (0,1:67:10:10:13 v/v/v/v/v); Modo isocrático.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Extração em fase sólida (Isolute IST – sílica). Eluir com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar. Analisar.	LD: 1 ng mL <sup>-1</sup>	MATABUDUL; LUMLEY; POINTS, 2002



ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Sulfonamidas	LC-MS (ESI - modo positivo) Coluna Alltima C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) água, ambos contendo ácido fórmico 5 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Misturar com areia (matriz de dispersão em fase sólida - MSPD). Extrair com água quente (100 °C, pH 3,1). Filtrar com fibra de vidro e celulose regenerada. Analisar.	LD: 1-3 ng g <sup>-1</sup> LQ: 2-6 ng g <sup>-1</sup>	BOGIALLI <i>et al.</i> , 2003
Sulfonamidas	LC-MS (ESI - modo positivo) Coluna Alltima C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 35 °C; Fase móvel: (A) metanol e (B) água, ambos contendo ácido fórmico 5 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Extrair com água. Filtrar (filtro de papel). Extração em fase sólida (Carboglyph 4). Eluir com metanol seguido por diclorometano/ metanol (80:20 v/v), acidificado com ácido trifluoracético 10 mmol L <sup>-1</sup> . Evaporar parcialmente o solvente e dissolver em água contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> de acetato de amônio. Filtrar (Teflon). Analisar.	LD: 3-10 ppb LQ: 5-13 ppb	CAVALIERE <i>et al.</i> , 2002
Coccidiostáticos	LC-MS (ESI - modo positivo e negativo) Coluna C18 Chromolith Performance (100 x 4,6 mm); Termostato: 26 °C; Fase móvel para tiamulina: metanol/água (55:45 v/v) contendo 0,1% de ácido acético; Modo isocrático. Fase móvel para os demais analitos: (A) acetonitrila e (B) água contendo 0,1% de ácido acético; Modo gradiente.	Extrair com acetona/tetrahidrofurano (6:4 v/v). Extração líquido-líquido com diclorometano. Evaporar a camada orgânica e dissolver em metanol/ácido 1-heptano sulfônico sódico 0,022 mol L <sup>-1</sup> e hidrogenofosfato dissódico-2-hidratado 0,01 mol L <sup>-1</sup> (70:30 v/v, pH 6,0) e hexano. Filtrar a fração metanol (filtro Spin-X). Analisar.	LQ: 2-5 ng g <sup>-1</sup>	HORMAZABAL; YNDESTAD; OSTENSVIK, 2003
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar (PVDF). Analisar.	CC $\alpha$ : 0,75-6 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 0,9-8,3 µg kg <sup>-1</sup>	MORTIER; DAESELEIRE; DELAHAUT, 2003

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Tetraciclínas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Puresil C18; Fase móvel: (A) água contendo 0,5% de ácido fórmico e 1 mol L <sup>-1</sup> de acetato de amônio pH 2,5 e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar com tampão citrato 1 mol L <sup>-1</sup> , pH 5. Extrair com acetonitrila. Misturar o sobrenadante com água destilada. Evaporar o solvente. Dissolver em metanol. Analisar.	LQ: 20 µg kg <sup>-1</sup>	SCZESNY; NAU; HAMSCHER, 2003
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Purospher C18 (125 x 3 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Extração em fase sólida (sílica). Eluir com acetonitrila. Evaporar o solvente. Dissolver com acetonitrila. Analisar.	Não relatado	DUBOIS; PIERRET; DELAHAUT, 2004
Ionóforos Macrolídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna YMC Fenil (50 x 4 mm; 3 µm); Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Redissolver em hexano. Extração em fase sólida (sílica). Eluir com metanol. Evaporar o solvente. Dissolver em metanol. Filtrar (PVDF). Analisar.	Não relatado	HELLER; NOCHETTO, 2004
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Waters Symetry C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir em salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,5). Cromatografia de imunoafinidade. Eluir com etanol/água (80:20 v/v, pH 3). Evaporar parcialmente o solvente. Analisar.	CC $\alpha$ : 1,26 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 2,16 µg kg <sup>-1</sup>	MORTIER <i>et al.</i> , 2004
Tetraciclínas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Genesis C18 Column (50 x 2,1 mm; 4 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) água contendo 0,2% de ácido fórmico e 0,1 mmol L <sup>-1</sup> de ácido oxálico; Modo gradiente.	Extrair com tampão Tetrasensor®. Filtrar. Diluir com água. Analisar.	Não relatado	ALFREDSSON <i>et al.</i> , 2005

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Nitrofuranos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Jones C18 (100 x 2,1 mm; 4 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila/água (90:10 v/v), ambos contendo 0,1% de ácido acético; Modo gradiente.	Hidrolisar e derivatizar com ácido clorídrico 0,2 mol L <sup>-1</sup> e 2-nitrobenzaldeído 100 mmol L <sup>-1</sup> , sob proteção da luz. Extrair com acetato de etila. Evaporar o solvente. Redissolver em acetonitrila/água (10:90 v/v) e 0,1% de ácido acético. Centrifugar e remover a camada de gordura. Analisar.	LQ: 0,5 ng g <sup>-1</sup>	FINZI <i>et al.</i> , 2005
Fluorquinolonas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna X-Terra C18 (150 x 2,1 mm; 3,5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água (10:90 v/v; pH 2,8); Modo isocrático.	Misturar com tampão de ácido cítrico/citrato de sódio pH 6 e álcool isopropílico. Realizar diálise com diclorometano e álcool isopropílico. Evaporar o solvente. Dissolver com 2% de ácido fórmico. Analisar.	Não relatado	LOLO <i>et al.</i> , 2005
Ionóforos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) água/acetonitrila (95:5 v/v) e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico / Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Redissolver em acetonitrila/água (90:10 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	CCα: 1 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 1,2-1,6 µg kg <sup>-1</sup>	MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005a
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Waters Symmetry C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Termostato: 35 °C; Fase móvel: (A) água/acetonitrila (95:5 v/v), contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Análise da dinitrocarbanilida, robenidina e diclazuril: extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar (PVDF). Análise de dimetridazol, 2-hidroxidimetridazol e halofuginona: extrair com acetonitrila. Adicionar hexano. Descartar a fração hexano. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar (PVDF). Analisar.	CCα: 0,5-2 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,6-2,2 µg kg <sup>-1</sup>	MORTIER; DAESELEIRE; VAN PETEGHEM, 2005b

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Anfenicóis	LC-MS (ESI - modo negativo) Coluna Inertsil ODS-2 (250 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 25 °C; Fase móvel: acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> /acetonitrila (60:40 v/v); Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio. Centrifugar. Adicionar hexano. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Dissolver com acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> /acetonitrila (60:40 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 0,2-0,4 ng g <sup>-1</sup>	PENNEY <i>et al.</i> , 2005
Macrolídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna YMC ODS-AQ S-3 (50 x 2 mm); Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) água contendo 1% de ácido fórmico e (C) água; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio e hexano. Remover a camada de hexano. Evaporar o solvente. Redissolver em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 8. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com água e 40% de metanol em água. Eluir com 95% de metanol. Evaporar o solvente. Dissolver com acetato de amônio 0,1 mol L <sup>-1</sup> e acetonitrila (85:15 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: < 1 µg kg <sup>-1</sup>	WANG; LEUNG; BUTTERWORTH, 2005
Nitrofuranos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Atlantis C18 (150 x 2,1 mm; 3 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) água contendo formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> e (B) metanol; Modo gradiente.	Hidrolisar e derivatizar com ácido clorídrico 0,2 mol L <sup>-1</sup> e 2-nitrobenzaldeído a 10 mg mL <sup>-1</sup> , respectivamente. Incubar durante a noite a 40 °C. Adicionar hidrogênio ortofosfato dipotássico 2 mol L <sup>-1</sup> e hidróxido de sódio 2 mol L <sup>-1</sup> . Extração em fase sólida (Strata SDB-L). Lavar com água. Eluir com acetato de etila. Evaporar o solvente. Redissolver em água/metanol (60:40 v/v). Filtrar. Analisar.	LD: 0,15-0,40 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 0,20-0,80 µg kg <sup>-1</sup>  CCα: 0,41-0,91 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 0,46-0,95 µg kg <sup>-1</sup>	SZILAGYI; DE LA CALLE, 2006

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Corticóides	UPLC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) metanol e (B) água contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Misturar com tampão acetato 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 5,2. Adicionar β-glucuronidase/arilsulfatase. Incubar durante a noite a 37 °C. Extrair com metanol. Adicionar hexano. Remover a camada de hexano. Adicionar 1-propanol. Evaporar o solvente. Redissolver com água/metanol (32:8 v/v). Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com água. Eluir com metanol. Dissolver com clorofórmio/hexano (1:10 v/v). Extração em fase sólida (Sep-Pak de sílica). Lavar com hexano. Eluir com água saturada com acetato de etila. Eluir com metanol/acetato de etila (40:60, v/v) por um cartucho de extração em fase sólida (aminopropil). Reconstituir com metanol. Analisar.	LD: 0,01-0,38 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,04-1,27 µg kg <sup>-1</sup>	CUI <i>et al.</i> , 2006
Tetraciclinas Fluorquinolonas Quinolonas Sulfonamidas Penicilinas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Fenil YMC (50 x 4 mm; 3 µm); Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar com tampão de succinato de sódio. Centrifugar. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com água. Eluir com metanol. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com água. Centrifugar. Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: ≤ 50 ng mL <sup>-1</sup>	HELLER <i>et al.</i> , 2006
Macrolídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Puresil C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 23 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,5% de ácido fórmico e acetato de amônio 1 mmol L <sup>-1</sup> , pH 2,5 e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar com tampão de acetato 1 mol L <sup>-1</sup> , pH 5. Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Reconstituir com metanol. Centrifugar. Analisar.	LQ: 1 µg kg <sup>-1</sup>	HAMSCHER <i>et al.</i> , 2006

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Nitroimidazóis	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Symmetry Shield C18 (150 x 2,1 mm; 3,5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio. Centrifugar. Evaporar a fase orgânica superior. Reconstituir com água destilada. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com água/metanol (95:5 v/v). Eluir com metanol. Evaporar parcialmente o solvente. Redissolver com água. Filtrar (nylon). Analisar.	CC $\alpha$ : 0,07-0,36 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 0,11-0,60 µg kg <sup>-1</sup>	MOTTIER <i>et al.</i> , 2006
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 Column (150 x 3 mm; 5 µm); Fase móvel: acetonitrila/água contendo acetato de amônio 2 mmol L <sup>-1</sup> e 2% de ácido acético (95:5 v/v); Modo isocrático.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Extração em fase sólida (Isolute IST – sílica). Eluir com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Dissolver em fase móvel. Filtrar. Analisar.	CC $\alpha$ : 0,8-1,4 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 0,9-2,0 µg kg <sup>-1</sup>	ROKKA; PELTONEN, 2006
Anfenicóis	LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Purospher Star RP-18 (55 x 4 mm; 3 µm); Termostato: 23 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,15% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar clorofórmio. Evaporar a camada orgânica. Reconstituir com metanol/água (3:4 v/v). Filtrar (filtro Spin-X). Analisar.	CC $\alpha$ : 0,02 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 0,04 µg kg <sup>-1</sup>	RONNING; EINARSEN; ASP, 2006
Nitroimidazóis	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Symmetry C8 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,2% de ácido acético; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Filtrar. Analisar.	CC $\alpha$ : 0,05-0,25 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 0,51-0,68 µg kg <sup>-1</sup>	XIA <i>et al.</i> , 2006

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Nitrofuranos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 (150 x 2 mm; 3 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) formiato de amônio 20 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Hidrolisar e derivatizar com ácido clorídrico 0,2 mol L <sup>-1</sup> e 2-nitrobenzaldeído 100 mmol L <sup>-1</sup> , respectivamente. Incubar durante a noite a 37 °C. Adicionar uma solução tampão de fosfato trissódico a 0,3 mol L <sup>-1</sup> e de hidróxido de sódio 2 mol L <sup>-1</sup> . Adicionar acetato de etila. Evaporar a camada de acetato de etila. Redissolver com hexano e metanol/formiato de amônio 20 mmol L <sup>-1</sup> (15:85 v/v, pH 4). Descartar a fração hexano. Filtrar. Analisar.	CC <sub>α</sub> : 0,026-0,218 µg kg <sup>-1</sup>  CC <sub>β</sub> : 0,031-0,278 µg kg <sup>-1</sup>	BOCK; STACHEL; GOWIK, 2007
Fluorquinolonas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Waters XTerra C18 (100 x 2,1 mm; 3;5 µm); Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (C) água ultra-pura; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila contendo 2% de ácido acético. Adicionar cloreto de sódio. Centrifugar. Adicionar hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Redissolver em tampão fosfato 50 mmol L <sup>-1</sup> , pH 3). Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com 30% de metanol em água. Eluir com acetonitrila/metanol (80:20 v/v). Redissolver com 10% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,2%. Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 0,22-0,32 µg kg <sup>-1</sup>  CC <sub>α</sub> : 0,30-0,45 µg kg <sup>-1</sup>  CC <sub>β</sub> : 0,60-0,91 µg kg <sup>-1</sup>	DURDEN; MACPHERSON, 2007
Sulfonamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 Phenomenex Aqua Column (150 x 2 mm; 3 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,05% de ácido fórmico e (B) acetonitrila/metanol (90:10 v/v); Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Evaporar o solvente. Dissolver com tampão acetato de amônio 0,2 mol L <sup>-1</sup> , pH 5,3. Adicionar hexano e centrifugar. Descartar a fração hexano. Extração em fase sólida (Strata-X). Lavar com água. Eluir com acetonitrila. Analisar.	CC <sub>α</sub> : 7,4-26 µg kg <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> : 9,3-40 µg kg <sup>-1</sup>	TAMOSIUNAS; PADARAUSKAS, 2007

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Macrolídeos	LC-QTOF-MS (ESI - modo positivo) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 45 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água contendo acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente. LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna YMC ODS-AQ S-3 (50 x 2 mm); Termostato: 35 °C; Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) 1% de ácido fórmico e (C) água; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio e hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Redissolver com tampão fosfato. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Eluir com 95% de metanol. Evaporar o solvente. Dissolver com acetato de amônio 0,1 mol L <sup>-1</sup> / acetonitrila (85:15 v/v).	CLUE LD: 0,2-1,0 µg kg <sup>-1</sup>  HPLC LD: 0,01-0,5 µg kg <sup>-1</sup>	WANG; LEUNG, 2007
Tetraciclínas Quinolonas	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 Acquity UPLC BEH (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,2% de ácido fórmico e (B) metanol/acetonitrila (40:60 v/v); Modo gradiente.	Extraír com tampão de EDTA-McIlvaine. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com tampão de EDTA-McIlvaine, água e 5% de metanol em água. Eluir com metanol. Evaporar o solvente. Reconstituir com água contendo 0,2% de ácido fórmico. Analisar.	LD: 0,02-1,30 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,02-4,29 µg kg <sup>-1</sup>	JIA <i>et al.</i> , 200)
Benzimidazóis Ionóforos Macrolídeos Nitroimidazóis Antiinflamatórios Quinolonas Sulfonamidas Tetraciclínas Tranquilizantes Pesticidas Toxinas	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo) ULPC-TOF-MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Acquity BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) água e (B) água/metanol (5:95 v/v), ambos contendo formiato de amônio 1 mmol L <sup>-1</sup> e 20 µL L <sup>-1</sup> de ácido fórmico; Modo gradiente. LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Symmetry C18 Column (150 x 3 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água e (B) água/metanol (5:95 v/v), ambos contendo formiato de amônio 1 mmol L <sup>-1</sup> e 20 µL L <sup>-1</sup> de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico. Centrifugar. Analisar.	LD: 0,01-0,05 mg kg <sup>-1</sup>	MOL, H. G. J. <i>et al.</i> , 2008



ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Quinolonas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Symmetry Shield C18 (150 x 2,1 mm; 5 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico, (B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e (C) metanol; Modo gradiente.	Extrair com uma solução de tampão fosfato pH 4. Adicionar hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Extração em fase sólida (Oasis HLB). Lavar com metanol/água (4:6 v/v). Eluir com metanol/água (8:2 v/v). Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com fase móvel. Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 0,05-0,2 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,5-1 µg kg <sup>-1</sup>	SHEN <i>et al.</i> , 2008
Macrolídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Alltima HyPurity C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água, ambos contendo ácido fórmico 20 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir e acidificar com ácido fórmico 10 mmol L <sup>-1</sup> para pH 5. Filtrar (PTFE). Analisar.	LD: 0,2 ng g <sup>-1</sup> LQ: ≤ 0,5 ng g <sup>-1</sup> CCα: 5,5-230 ng g <sup>-1</sup> CCβ: 7,4-290 ng g <sup>-1</sup>	BOGIALLI; CIAMPANELLA; <i>et al.</i> , 2009
Quinolonas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Alltima HyPurity C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água, ambos contendo ácido fórmico 20 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Misturar com areia (dispersão em matriz de fase sólida). Extrair com água quente (100 °C) contendo ácido fórmico 50 mmol L <sup>-1</sup> . Filtrar (fibra de vidro). Analisar.	CCα: 0,41-2,6 ng g <sup>-1</sup> CCβ: 0,64-3,7 ng g <sup>-1</sup> LD: 0,1-0,6 ng g <sup>-1</sup> LQ: 0,2-0,6 ng g <sup>-1</sup>	BOGIALLI; D'ASCENZO; <i>et al.</i> , 2009
Nitroimidazóis	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 (100 x 2 mm; 3 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido acético; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar cloreto de sódio e centrifugar. Misturar a camada orgânica com hexano. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Reconstituir com água/acetonitrila (95:5 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	CCα: 0,33-1,26 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,56-2,15 µg kg <sup>-1</sup>	CRONLY <i>et al.</i> , 2009
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Zorbax Eclipse XDB C8 (150 x 3 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água, (B) metanol e (C) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Redissolver com acetato de sódio 20 mmol L <sup>-1</sup> /acetonitrila (50:50 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	CCα: 0,27-0,98 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,37-1,38 µg kg <sup>-1</sup>	DUBREIL-CHENEAU <i>et al.</i> , 2009

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Coccidiostáticos	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 40 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila. Evaporar o solvente. Reconstituir com metanol. Analisar.	LQ: 0,1-0,2 µg kg <sup>-1</sup>	SHAO <i>et al.</i> , 2009
Sulfonamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna ODS(2) C18 (75 x 4,6 mm; 3 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) água contendo formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> e 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com diclorometano/acetona (50:50 v/v). Adicionar cloreto de sódio e sulfato de sódio anidro. Decantar. Adicionar ácido acético. Extração em fase sólida (sulfônico aromático). Lavar com água e metanol. Eluir com metanol/amônia (97,5:2,5 v/v). Evaporar o solvente. Redissolver com fase móvel. Analisar.	CCα: 16,1-20,5 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 16,9-25,7 µg kg <sup>-1</sup>	FORTI; SCORTICHINI, 2009
Benzimidazóis Macrolídeos Penicilinas Quinolonas Sulfonamidas Tetraciclinas Nitroimidazóis Tranquilizantes Antiinflamatórios Coccidiostáticos Ionóforos Anfenicóis Trimetoprim Pirimidinas	UPLC-TOF-MS (ESI - modo positivo) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila/água (6:4 v/v). Centrifugar. Diluir com água. Extração em fase sólida (Strata-X). Lavar com água. Eluir com metanol/acetato de etila (1:1 v/v). Evaporar o solvente. Redissolver com acetonitrila. Diluir com água contendo 0,1% de ácido fórmico. Analisar.	CCβ: 4,7-2119 µg kg <sup>-1</sup>	PETERS <i>et al.</i> , 2009

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Anfenicóis	LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Jones Chromatography C18 (100 x 2,1 mm; 4 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) água e (B) metanol; Modo gradiente.	Extraír com uma solução de extração de fosfato. Adicionar acetato de etila. Evaporar a camada orgânica. Redissolver com metanol/água (50:50 v/v). Centrifugar. Analisar.	LD: 0,03 ng g <sup>-1</sup> LQ: 0,1 ng g <sup>-1</sup>	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2009
Nitrofuranos	LC-MS/MS (APCI - modo positivo) Coluna XTerra MS C18 (150 x 2,1 mm; 3,5 µm); Termostato: 25 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido acético e (B) acetonitrila/água/ácido acético (90:10:0,1 v/v/v); Modo gradiente.	Hidrolisar e derivatizar com ácido clorídrico 0,1 mol L <sup>-1</sup> e 2-nitrobenzaldeído 0,2 mol L <sup>-1</sup> , respectivamente. Incubar durante a noite a 37 °C. Adicionar uma solução tampão de fosfato trissódico a 0,3 mol L <sup>-1</sup> e de hidróxido de sódio 2 mol L <sup>-1</sup> . Extração em fase sólida (Oasis MCX). Eluir com acetato de etila. Evaporar o solvente. Redissolver com água/acetonitrila (1:1 v/v). Filtrar. Analisar.	CC $\alpha$ : 0,20 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 0,25 µg kg <sup>-1</sup>	STASTNY <i>et al.</i> , 2009
Tetraciclínas Macrolídeos Quinolonas Sulfonamidas Benzimidazóis Avermectinas	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm); Fase móvel: (A) metanol e (B) água contendo 0,05% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila, ácido cítrico 0,5 mol L <sup>-1</sup> , pH 4 e EDTA 0,1 mmol L <sup>-1</sup> . Extração em fase sólida (Oasis HLB). Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com metanol/água, contendo 0,05% de ácido fórmico (50:50 v/v). Filtrar (nylon). Analisar.	LQ: 0,1-5,0 µg kg <sup>-1</sup>  Substâncias proibidas CC $\alpha$ : 2,1-13,5 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 4,7-25,4 µg kg <sup>-1</sup>  Substância permitidas C $\alpha$ e CC $\beta$ ≤ 241,6 µg kg <sup>-1</sup>	FRENICH <i>et al.</i> , 2010

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Benzimidazóis	LC-MS (ESI - modo positivo) Coluna Shim-pack VP-ODS (150 x 2 mm; 5 µm); Fase móvel: (A) água contendo ácido fórmico 5 mmol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Diluir com solução de fosfato 20 mmol L <sup>-1</sup> (pH 5). Centrifugar. Filtrar. Micro-extração (polímero monolítico). Lavar com solução de fosfato 20 mmol L <sup>-1</sup> e água. Eluir com acetonitrila. Evaporar o solvente. Reconstituir com acetonitrila/água (5:95 v/v). Analisar.	LD: 0,56-2,76 ng g <sup>-1</sup> LQ: 1,88-9,20 ng g <sup>-1</sup>	HU; WANG; FENG, 2010
Organofosforado	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Zorbax SB C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,05 mmol L <sup>-1</sup> e 0,1% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.	Misturar com sulfato de magnésio anidro. Extrair com acetonitrila. Extração em fase sólida (sílica gel). Lavar com hexano. Eluir com diclorometano. Evaporar o solvente. Reconstituir com metanol. Analisar.	CC <sub>α</sub> : ≤ 0,0044 mg kg <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> : ≤ 0,0224 mg kg <sup>-1</sup>	LEE <i>et al.</i> , 2010
Anfenicóis	LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Halo Fused-Core C18 (50 x 2,1 mm; 2,7 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar com água. Colocar em um banho de água a 60 °C. Extração em fase sólida (nanotubos de carbono). Lavar com água. Eluir com o solvente adequado. Evaporar o solvente. Redissolver com fase móvel. Analisar.	LD: 0,004 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 0,012 µg kg <sup>-1</sup> CC <sub>α</sub> : 0,009 µg kg <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> : 0,011 µg kg <sup>-1</sup>	LU <i>et al.</i> , 2010
Nitroimidazóis	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Gemini ODS (150 x 2 mm; 5 µm) Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Adicionar sulfato de sódio anidro. Filtrar (papel de filtro contendo sulfato de sódio anidro). Extração em fase sólida (SPE SCX). Lavar com acetona, metanol e acetonitrila. Eluir com acetonitrila/hidróxido de amônio (95:5 v/v). Evaporar o solvente. Dissolver com fase móvel. Analisar.	CC <sub>α</sub> : 0,05-0,44 µg kg <sup>-1</sup> CC <sub>β</sub> : 0,08-0,90 µg kg <sup>-1</sup>	MITROWSKA; POSYNIK; ZMUDZKI, 2010

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Ionóforos Macrolídeos Lincosamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna ACE C18 (50 x 2,1 mm; 3 µm) Termostato: 35 °C; Fase móvel: (A) água, (B) acetonitrila e (C) metanol, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Evaporar o solvente. Reconstituir com acetato de sódio 5 mmol L <sup>-1</sup> /metanol (70:30 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 0,04-1,60 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 0,14-5,3 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\alpha$ : 0,87-229,7 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 1,74-262,7 µg kg <sup>-1</sup>	SPISSO <i>et al.</i> , 2010
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna Inertsil ODS-3 (150 x 2,1 mm; 4,6 µm); Fase móvel: acetonitrila/água contendo 0,1% ácido acético (55:45 v/v); Modo isocrático.	Extraír com acetato de etila e sulfato de sódio anidro. Evaporar o solvente. Dissolver com acetato de etila/ciclohexano (50:50 v/v). Cromatografia de permeação em gel. Eluir com acetato de etila/ciclohexano (50:50 v/v). Evaporar o solvente. Dissolver com metanol/água (80:20 v/v). Filtrar. Analisar.	LD: ≤ 0,3 µg L <sup>-1</sup> LQ: ≤ 1,8 µg kg <sup>-1</sup>	Al <i>et al.</i> , 2011
Sulfonamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna XTerra C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) Termostato: 30 °C; Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Adicionar água. Evaporar parcialmente o solvente. Extração em fase sólida (Bond Elut C18). Eluir com acetonitrila. Adicionar água. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com fase móvel. Analisar.	CC $\alpha$ : 101,0-122,1 ng g <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 114,5-138,8 ng g <sup>-1</sup>	DE LA CRUZ <i>et al.</i> , 2011
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna C18 Synergi Fusion (150 x 2,0 mm; 4 µm); Termostato: 40 °C Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e acetato de sódio 0,02 mmol L <sup>-1</sup> ; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila e sulfato de sódio anidro. Adicionar hexano e centrifugar. Descartar a fração orgânica superior. Extração em fase sólida (sílica). Eluir com acetonitrila. Evaporar o solvente. Redissolver com metanol. Filtrar. Analisar.	CC $\alpha$ : 2,2-174 µg kg <sup>-1</sup> CC $\beta$ : 2,4-201 µg kg <sup>-1</sup>	GALARINI <i>et al.</i> , 2011

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
B-agonistas Benzimidazóis Corticóides Nitroimidazóis Quinolonas Sulfonamidas Tetraciclinas Benzodiazepínicos Trimetoprim, Trifenilmetano	UPLC-QTOF-MS (ESI - modo positivo) Coluna C18 Agilent Zorbax Eclipse XDB (100 x 3,0 mm; 1,8 µm); Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e formiato de amônio 5 mmol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Misturar com sulfato de sódio anidro. Extrair com acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico. Repetir a extração com acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico e acetato de etila. Evaporar o solvente. Reconstituir com amônia a 5%/metanol (1:1 v/v). Extração em fase sólida (Oasis HLB). Eluir com amônia/metanol (5:95 v/v). Evaporar o solvente. Redissolver com água/acetonitrila (7:3 v/v). Analisar.	LD: 0,01-5,96 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 0,04-18,45 µg kg <sup>-1</sup>	DENG <i>et al.</i> , 2011
Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna XTerra C18 (100 x 2,1 mm; 3,5 µm) Fase móvel: (A) acetonitrila, (B) 1% de ácido fórmico e formiato de amônio 100 mmol L <sup>-1</sup> e (D) água; Modo gradiente.  LC-MS/MS (ESI - modo negativo) Coluna XTerra C18 (100 x 3,0 mm; 3,5 µm) Fase móvel: (A) acetonitrila, (C) tampão trietilamina 10 mmol L <sup>-1</sup> e (D) água (70:20:10 v/v/v); Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila. Adicionar sulfato de sódio anidro. Centrifugar. Extração em fase sólida (SPE NH <sub>2</sub> ). Evaporar o solvente. Redissolver com acetonitrila contendo formiato de amônio 1 mmol L <sup>-1</sup> . Filtrar (PVDF). Analisar.	LD: 0,007-0,039 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 0,019-0,076 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\alpha$ : 0,005-0,033 µg kg <sup>-1</sup>  CC $\beta$ : 0,008-0,043 µg kg <sup>-1</sup>	DMITROVIC; DURDEN, 2011
Sulfonamidas Quinolonas Tetraciclinas Macrolídeos Penicilinas Lincosamidas Trimetoprim Pirimidinas	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 µm); Fase móvel: (A) água contendo 0,02% de ácido fórmico e ácido oxálico 1 mmol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Misturar com terra diatomácea contendo EDTA. Colocar a mistura em uma célula de extração contendo filtro de celulose. Extrair com acetonitrila/tampão de ácido succínico 0,01 mmol L <sup>-1</sup> pH 6 (1:1 v/v). Extração por líquido pressurizado (5 min, 70 °C e 1500 psi). Diluir com acetonitrila/tampão de ácido succínico 0,01 mmol L <sup>-1</sup> pH 6 (1:1 v/v). Centrifugar. Evaporar o solvente. Redissolver em água. Filtrar. Analisar.	Substâncias proibidas CC $\alpha$ : 0,5-3,8 µg kg <sup>-1</sup>	JIMENEZ <i>et al.</i> , 2011

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Nitrofuranos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Agilent Zorbax XDB C18 (150 x 2,1 mm; 3,5 µm); Termostato: 40 °C Fase móvel: (A) formiato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4): metanol (9:1 v/v) e (B) formiato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4): metanol (1:9 v/v); Modo gradiente.	Determinação de furaltadona e nifursol: Extrair com acetato de etila. Evaporar o solvente. Adicionar acetonitrila e hexano. Centrifugar. Descartar a fração hexano. Evaporar o solvente. Dissolver em metanol/água (1:1 v/v). Analisar. Determinação de furaltadona e metabolitos nifursol: Hidrolisar e derivatizar com ácido clorídrico 0,2 mol L <sup>-1</sup> e 2-nitrobenzaldeído (2-NBA) 100 mmol L <sup>-1</sup> , respectivamente. Incubar durante a noite a 37 °C. Adicionar uma solução tampão de fosfato trissódico 0,3 mol L <sup>-1</sup> e hidróxido de sódio 2 mol L <sup>-1</sup> . Adicionar acetato de etila. Evaporar a fração de acetato de etila. Dissolver em formiato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> (pH 4)/metanol (85:15 v/v). Filtrar (PVDF). Analisar.	Metabólitos CCα: 0,1-0,3 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 0,5-0,9 µg kg <sup>-1</sup>  Drogas CCα: 0,9-1,3 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 2-3,1 µg kg <sup>-1</sup>	BARBOSA <i>et al.</i> , 2012
Tetraciclinas Ionóforos Coccidiostáticos Penicilinas Fluorquinolonas Sulfonamidas Micotoxinas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna ACE C18 (150 x 2,1 mm; 3 µm) Termostato: 40 °C Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com metanol/água/ácido acético (80:20:1 v/v/v), acetato de sódio e sulfato de sódio anidro. Aplicar o sobrenadante em um filtro de seringa Acrodisc GHP. Analisar.	LD: 0,9-27,1 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 1,3-28,7 µg kg <sup>-1</sup>  CCα: 11,9-246 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 14,0-283 µg kg <sup>-1</sup>	CAPRIOTTI <i>et al.</i> , 2012

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Quinolonas Fluouquinolonas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 (150 x 2 mm; 3 µm) / Termostato: 35 °C Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água contendo 0,025% de ácido heptafluorbutírico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Adicionar uma solução de amônia a 25%. Centrifugar. Adicionar cloreto de sódio. Transferir a camada orgânica para tubos de centrífuga contendo 100 mg de sorbente octadecil. Centrifugar. Evaporar o solvente. Dissolver em água. Analisar.	LD: 0,5-1 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,5-3 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 3-7 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 6-11 µg kg <sup>-1</sup>	GAJDA <i>et al.</i> , 2012
Lincosamidas Coccidiostáticos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Capcell Pak C18 (150 x 2 mm; 5 µm); Termostato: 40 °C Fase móvel: (A) água contendo formiato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> e 1% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Evaporar o solvente. Adicionar solução de tampão fosfato 0,2 mol L <sup>-1</sup> . Extração em fase sólida (SPE C18). Lavar com água e acetona 2% em hexano. Eluir com metanol. Evaporar o solvente. Dissolver em metanol. Filtrar. Analisar.	LD: 0,6-1,5 ng g <sup>-1</sup> LQ: 2-5 ng g <sup>-1</sup>	KIM <i>et al.</i> , 2012
Coccidiostáticos	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Acquity UPLC BEH C8 (50 x 2,1 mm; 1,7 µm); Termostato: 60 °C Fase móvel: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extraír com acetonitrila. Evaporar o solvente. Reconstituir com acetonitrila/água (80:20 v/v). Filtrar (PTFE). Analisar.	LQ: ≤ 50 µg kg <sup>-1</sup>  CCα: 1,13- 179 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 1,29- 209 µg kg <sup>-1</sup>	MOLONEY <i>et al.</i> , 2012
Sulfonamidas Quinolonas Coccidiostáticos Antiparasitários	LC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Synchronis aQ (100 x 2,1 mm; 5 µm); Termostato: 40 °C Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e acetato de amônio 10 mmol L <sup>-1</sup> e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Método A: Extraír com água e acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico. Adicionar sulfato de magnésio, citrato trissódico e cloreto de sódio. Diluir com acetonitrila contendo 1% de ácido fórmico. Centrifugar. Analisar. Método B: Extraír com água e acetonitrila. Adicionar sulfato de magnésio, citrato trissódico e cloreto de sódio. Diluir com acetonitrila. Centrifugar. Analisar.	LQ: 0,001- 0,01 µg g <sup>-1</sup>	NAKAJIMA <i>et al.</i> , 2012



ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Aminoglicosídeos	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna HILIC CAPCELL PAK ST (150 x 2 mm; 5 µm); Termostato: 30 °C Fase móvel: (A) acetonitrila e (B) água contendo 0,1% de ácido trifluoroacético; Modo gradiente.	Misturar com uma solução de fosfato monopotássico 10 mmol L <sup>-1</sup> (incluindo solução de EDTA 0,4 mmol L <sup>-1</sup> ). Centrifugar. Adicionar 5% de ácido tricloroacético e centrifugar. Adicionar hexano e centrifugar. Descarte a fração hexano. Extração em fase sólida (SPE CBA - ácido carboxílico). Lavar com metanol. Eluir com metanol contendo 2% de ácido fórmico. Evaporar o solvente. Reconstituir com fase móvel. Filtrar. Analisar.	LD: 5-10 µg kg <sup>-1</sup> LQ: ≤ 0,20 µg kg <sup>-1</sup>  CCα: 8,1-11,8 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 16,4-21,8 µg kg <sup>-1</sup>	TAO <i>et al.</i> , 2012
Lincosamidas	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Kinetex XB (100 x 3 mm; 2,6 µm); Termostato: 30 °C; Fase móvel: acetonitrila/água contendo 0,1% de ácido fórmico (7:93 v/v; pH 2,6); Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Diluir com uma solução de ácido acético a 0,01% (pH 4,7). Extração em fase sólida (SPE Strata-XC). Lavar com uma solução de 0,01% de ácido acético (pH 4,7) e metanol. Eluir com metanol/amônia a 25% (95:5 v/v). Evaporar parcialmente o solvente. Redissolver com acetonitrila/ácido fórmico a 0,1% em água (7:93 v/v, pH 2,6). Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 0,5 µg kg <sup>-1</sup> LQ: 1,7 µg kg <sup>-1</sup> CCα: 160,8 µg kg <sup>-1</sup> CCβ: 179,1 µg kg <sup>-1</sup>	TOLGYESI; FEKETE; <i>et al.</i> , 2012
Nitroimidazóis	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Kinetex XB C18 (100 x 3 mm; 2,6 µm); Termostato: 35 °C Fase móvel: água contendo 0,1% de ácido fórmico/metanol (88:12 v/v; pH 2,6); Modo isocrático.	Extrair com acetonitrila. Evaporar parcialmente o solvente. Redissolver com água. Extração em fase sólida (SPE Strata-SDB). Lavar com água. Eluir com acetato de etila. Evaporar o solvente. Redissolver com 0,1% de ácido fórmico em água. Filtrar (nylon). Analisar.	LD: 0,05-0,10 µg kg <sup>-1</sup>  LQ: 0,17-0,33 µg kg <sup>-1</sup>  CCα: 0,05-0,10 µg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 0,08-0,15 µg kg <sup>-1</sup>	TOLGYESI; SHARMA; <i>et al.</i> , 2012

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (continuação)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Benzimidazóis Avermectinas Anfenicóis Penicilinas Macrolídeos Quinolonas Sulfonamidas Tetraciclinas β-agonistas Corticóides Ionóforos Nitroimidazóis Antiinflamatórios Tranquilizantes Esteróides Trimetoprim Pirimidinas	UPLC-MS/MS (ESI - modo positivo e negativo); Coluna Acquity UPLC HSS T3 (150 x 2,1 mm; 1,7 μm); Termostato: 50 °C. Fase móvel do modo negativo: (A) água e (B) acetonitrila. Fase móvel do modo positivo: (A) água e (B) acetonitrila, ambos contendo 0,05% de ácido fórmico; Modo gradiente.	Extrair com acetonitrila. Congelar a -70 °C. Recolher a camada orgânica. Evaporar o solvente. Reconstituir com acetonitrila/água (25:75 v/v). Centrifugar. Analisar.	CCβ < 500 μg kg <sup>-1</sup>	ROBERT <i>et al.</i> , 2013
Esteróides	LC-MS/MS (ESI - modo positivo) Coluna Luna C18 (150 x 2 mm; 5 μm) Fase móvel: (A) água contendo 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar com tampão acetato de sódio 0,4 mol L <sup>-1</sup> (pH 5,2). Extrair com metanol. Congelar a -18 °C e remover a gordura suspensa. Evaporar parcialmente o solvente. Adicionar uma solução de carbonato de sódio a 10% e terc-butil metil éter (TBME). Centrifugar. Recolher a camada superior de éter. Evaporar o solvente. Dissolver com solução aquosa de ácido fórmico a 0,1%/acetonitrila (90:10 v/v). Filtrar. Analisar.	CCα: 0,20-0,44 μg kg <sup>-1</sup>  CCβ: 1,03 μg kg <sup>-1</sup>	ZENG <i>et al.</i> , 2013

ANEXO 3 – MÉTODOS POR LC-MS PARA ANÁLISE DE RESÍDUOS DE MEDICAMENTOS EM OVOS (conclusão)

Classe ou Medicamento	Condições de análise	Processo de extração	Sensibilidade	Referência
Quinolonas Tetraciclinas Cefalosporinas Penicilinas Macrolídeos Sulfonamidas Benzimidazóis Nitroimidazóis Coccidiostáticos Antiinflamatórios Anfenicóis β-agonistas β-bloqueadores Esteróides Analgésicos Diuréticos Estatinas Lincosamidas Trimetoprim Aminoglicosídeos Benzodiazepínicos Outros	UPLC-MS/MS (ESI – modo positivo) Coluna Atlantis T3C18 (100 x 2,1 mm; 3 μm); Termostato: 30 °C Fase móvel: (A) água contendo 0,01% de ácido fórmico e (B) metanol; Modo gradiente.  UPLC-MS/MS (ESI – modo negativo) Coluna Atlantis T3C18 (100 x 2,1 mm; 3 μm); Termostato: 30 °C Fase móvel: (A) água contendo 1 mmol L <sup>-1</sup> de formiato de amônio, (B) metanol e (C) acetonitrila; Modo gradiente.	Misturar 1 g da amostra com 2 mL de água contendo 0,1% de ácido fórmico e 0,1% de EDTA. Extrair com 2 mL de metanol e 2 mL de acetonitrila. Acrescentar ao extrato 5 mL de hexano para remover a gordura. Descartar a fração hexano e evaporar o extrato. Reconstituir o resíduo com 1 mL de metanol/água contendo 0,05% de ácido fórmico (25:75 v/v). Filtrar. Analisar.	LD: ≥0,008 μg kg <sup>-1</sup> LQ: ≤3,15 μg kg <sup>-1</sup>	DASENAKI; THOMAIDIS, 2015

NOTA: LC-MS/MS: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial; UPLC-MS/MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas sequencial; UPLC-TOF-MS: cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas de alta resolução por tempo de voo; UPLC-QTOF-MS: cromatografia líquida de alta resolução acoplada a espectrometria de massas com analisador híbrido quadrupolo-tempo de voo; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CCα: limite de decisão e CCβ: capacidade de detecção.

---

## **ANEXO 4**

---

**Tampão citrato pH 3 – Farmacopeia Europeia (4012600)**

Dissolver 4,8 g de ácido cítrico em 80 mL de água. Ajustar o pH com hidróxido de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> e diluir para 100 mL.

**Tampão acetato pH 4,5 – Farmacopeia Europeia (4012500)**

Dissolver 77,1 g de acetato de amônio em água. Adicionar 70 mL de ácido acético glacial e diluir para 1000 mL.

**Tampão acetato pH 6 – Farmacopeia Europeia (4002200)**

Dissolver 100 g de acetato de amônio em 300 mL de água e adicionar 4,1 mL de ácido acético glacial. Ajuste o pH se necessário e dilua para 500 mL de água.

**Tampão fosfato pH 7 – Farmacopeia Europeia (4010200)**

Dissolver 28,4 g de fosfato de hidrogênio dissódico anidro e 18,2 g de dihidrogenofosfato de potássio em água e diluir para 500 mL com o mesmo solvente.

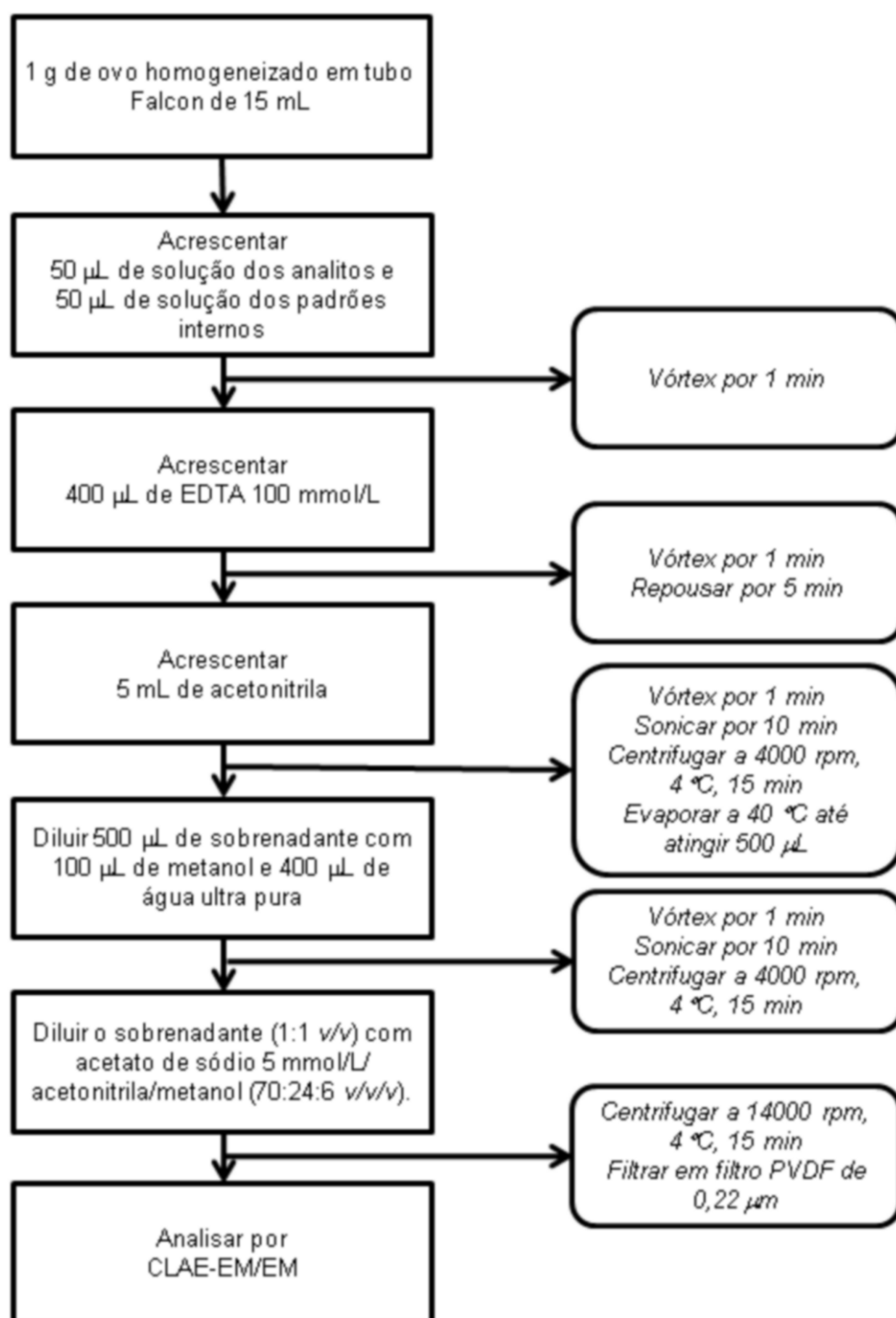
**Tampão fosfato pH 8 – Farmacopeia Europeia (4010400)**

Dissolver 20 g de fosfato de hidrogênio de dipotássio em 900 mL de água. Ajuste o pH com ácido fosfórico. Diluir para 1000 mL com água.

---

## **ANEXO 5**

---



---

## **ANEXO 6**

---



